

UNIVERSITE DE MONTPELLIER
FACULTE DES SCIENCES

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'IRRADIATION
ULTRA-VIOLETTE DE L'HEMOGLOBINE

THESE

présentée

à la Faculté des Sciences de Montpellier

pour obtenir le grade de Docteur es-Sciences (Sciences Naturelles)

par

Mme BASTONS née BOSC Geneviève

Attachée de Recherches au C.N.R.S.

Soutenue le **21 NOVEMBRE 1967**

devant la commission d'examen

JURY :

M. E. KAHANE

Président

M^{me} H. GUASTALLA

Assesseurs

M. E. ZUCKERKANDL

M. C. BENEZECH

Invité



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547409_0120

UNIVERSITE DE MONTPELLIER
FACULTE DES SCIENCES

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'IRRADIATION
ULTRA-VIOLETTE DE L'HEMOGLOBINE

THESE

présentée

à la Faculté des Sciences de Montpellier

pour obtenir le grade de Docteur ès-Sciences (Sciences Naturelles)

par

Mme BASTONS née BOSG Geneviève

Attachée de Recherches au C.N.R.S.

Soutenue le 21 NOVEMBRE 1967

devant la commission d'examen

JURY :

M. E. KAHANE *Président*

M^{me} H. GUASTALLA *Assesseurs*

M. E. ZUCKERKANDL

M. C. BENEZECH *Invité*

FACULTÉ DES SCIENCES
DE MONTPELLIER

LISTE DES PROFESSEURS

DOYEN : A. CASADEVALL

ASSESSEURS : Ch. SAUVAGE
P. DUMONTET

DOYEN HONORAIRE :
P. MATHIAS

PROFESSEURS HONORAIRES :

R. JACQUES	J. SOULA
M. CASTERAS	G. DENIZOT
E. CARRIERE	J. GRANIER
E. TURRIERE	Ch. BOUHET

PROFESSEURS TITULAIRES :

M. M. MOUSSERON	Chimie Organique
L. EMBERGER	Botanique
J. P. ROIG	Physique
P. CHATELAIN	Minéralogie et Cristallographie
Melle C. TUZET	Zoologie
Melle G. CAUQUIL	Chimie Organique
M. G. COUCHET	Mécanique Supérieure
J. SALVINIEN	Chimie-Physique
Melle A. M. VERGNOUX	Physique
M. J. AVIAS	Géologie
P. VIELES	Chimie
J. RABINOVITCH	Physique (C. S. U. P.)
E. KAHANE	Chimie Biologique
J. J. MOREAU	Mécanique Rationnelle
B. CHARLES	Mathématiques Pures
J. MOTTE	Biologie Végétale
R. JCUTY	Physique
P. DUMONTET	Physique
R. LEGENDRE	Zoologie
I. ASSENMACHER	Physiologie Animale
A. CASADEVALL	Chimie Organique
B. PISTOULET	Physique
Ch. ROUMIEU	Analyse Supérieure
J. ROBIN	Physique
A. POTIER	Chimie Minérale
R. LAFONT	Physique

M.	R. JACQUIER	Chimie
	J. FALGUEIRETTES	Minéralogie
	J. REGNIER	Chimie
Mme	J. CHARLES	Mathématiques
M.	P. CAILLON	Physique
	J. ROUZAUD	Chimie
	Ch. SAUVAGE	Botanique
	H. CHRISTOL	Chimie (E. N. S. I.)
	A. MARTINEAU	Mathématiques
Mme	G. VERNET	Biologie Animale
M.	L. CECCHI	Physique
	H. ANDRILLAT	Astronomie

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

Mme	M. L. de PCUCQUES	Botanique (C. S. U. P.)
M.	P. MURACOUR	Géophysique appliquée
Mme	M. LAFON	Mathématiques
M.	M. MATTAUER	Géologie
	G. TOURNE	Chimie
	L. EUZET	Zoologie (C. S. U. P.)
	J. REMY	Géologie
	P. DEMANGEON	Géologie
	A. BONNET	Botanique
	M. SAVELLI	Physique
	G. DELOUPY	Physique
Mme	S. ROBIN	Physique
M.	L. GRAMBAST	Botanique
	J. P. LAFON	Mathématiques
Mme	Ch. DUBOUL-RAZAVET	Géologie (C. S. U. P.)
M.	E. GROUBERT	Physique
Mme	H. GUASTALLA	Biologie physico-chimique
M.	G. LAMATY	Chimie
	F. PROUST	Géologie
Melle	A. BAILLETTE	Mathématiques (C. S. U. P.)

MAITRES DE CONFERENCES :

M.	R. GAUFRES	Chimie
	A. BASSOMPIERE	Physique
	R. MARTY	Psycho-Physiologie
	M. MAURIN	Chimie
	J. J. SOULIER	Chimie (C. S. U. P.)
	J. PARIS	Zoologie
	P. MOLINO	Mathématiques
	N. ROBY	Mathématiques (C. S. U. P.)

Mme PARIS-PIREYRE	Physiologie Végétale
M. G. BOUGNOT	Physique
Y. GUITTON	Physiologie Végétale (CSUP)
F. BOMBRE	Physique (C. S. U. P.)
C. PUISSEGUR	Biologie Animale (C.S. U. P.)
P. VIALLET	Chimie (C. S. U. P.)
L. THALER	Géologie
N.	Mathématiques (M. BOUX)

¹
CHARGES D'ENSEIGNEMENT :

M. M. LEFRANC	Mathématiques
A. STURER	Mathématiques
J. LEGRAND	Physiologie Animale

<u>SECRETAIRE PRINCIPAL</u>	E. SIAU
-----------------------------------	---------

- A mon mari,

- A mes parents,

- A mes enfants.

- A tous ceux qui m'ont témoigné
de l'amitié.

AVANT PROPOS

Monsieur le Professeur BENEZECH, Doyen de la Faculté de Médecine, m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son Laboratoire où, sous sa direction, j'ai eu la joie de réaliser ce travail. Guide rigoureux et d'une inlassable sollicitude, il m'a initiée à la Recherche et son exemple a été pour moi, au cours de ces années laborieuses, un stimulant des plus efficaces dans mes efforts.

Qu'il me permette aujourd'hui de lui exprimer, avec ma déférente admiration, mes sentiments de profonde gratitude.

Monsieur le Professeur KAHANE me fait l'honneur de présider le jury de ma thèse. Je lui adresse mes vifs remerciements pour le brillant enseignement qu'il m'a donné et la bienveillance qu'il m'accorde aujourd'hui.

Je fais respectueusement hommage de ce modeste travail à Madame le Professeur GUASTALLA qui est particulièrement qualifiée pour le juger. Elle a eu l'amabilité, au cours de plusieurs entretiens, de me faire bénéficier de sa compétence. Je tiens à l'en remercier vivement ainsi que pour la délicate sollicitude avec laquelle elle a secondé mes derniers efforts. Qu'elle me permette aussi de rappeler le grand intérêt que j'ai retiré de son enseignement.

Monsieur ZUCKERKANDL, Directeur de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique, me fait l'honneur de juger ce modeste travail. Qu'il me soit permis de le remercier et de l'assurer de mon profond respect.

Monsieur le Professeur LLORY s'est particulièrement occupé de cette thèse, et n'a cessé de me prodiguer de judicieux conseils tout au long de sa réalisation. Je lui en exprime ma vive reconnaissance.

J'exprime ma respectueuse et profonde gratitude à Monsieur le Professeur WURMSER pour la grande bienveillance qu'il m'a constamment témoignée au cours de son parrainage au Centre National de la Recherche Scientifique, et pour l'aide efficace de ses précieux conseils.

Les encouragements que m'a apportés Mademoiselle YON, Directeur de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique, ont été un élément déterminant dans la poursuite de ce travail. Je tiens à l'en remercier vivement.

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	1
TECHNIQUES D'ETUDE	3
<u>CHAPITRE I.</u> - EFFETS DE L'IRRADIATION UV SUR L'OXYHEMOGLOBINE	7
I. Viscosité	7
II. Spectres d'absorption	14
 <u>CHAPITRE II.</u> - MISE EN EVIDENCE DES DIFFE- RENCES ENTRE METHEMOGLO- BINE OBTENUE PAR IRRADIA- TION UV ET METHEMOGLOBINES OBTENUES PAR VOIE CHIMIQUE.	21
I. Différences spectrales	21
II. Electrophorèse	32
III. Dénaturation alcaline	35
IV. Quelques indications sur le comportement des désoxyhéoglobines obtenues à partir de méthémoglobine UV et à partir des mé- thémoglobines classiques	37
V. Labilité de la liaison hème-globine des méthémoglobines classiques et de la mé- thémoglobine UV	41
 <u>CHAPITRE III.</u> - ANALYSE DE L'EFFET DES RAYONS UV SUR L'OXYHEMO- GLOBINE	49
I. Irradiation séparée de l'hème et de la globine	49
II. Modification des groupements thiol dans la méthémoglobine obtenue par irradia- tion d'oxyhéoglobine	52
 <u>CHAPITRE IV.</u> - DISCUSSION D'ENSEMBLE	68
<u>CONCLUSION.</u> -	78
<u>BIBLIOGRAPHIE.</u> -	79

- INTRODUCTION -

Initialement, l'objet de ce travail était une étude comparative du comportement vis à vis de l'irradiation ultra-violette de deux types de protéines : sérum-albumine et hémoglobine. Tandis qu'on observait sur la sérum-albumine des modifications importantes de viscosité en relation avec une variation de structure, on constatait, en ce qui concernait l'hémoglobine, que la viscosité ne variait pas mais qu'il se produisait des modifications spectrales importantes ; cette observation était le point de départ d'une étude approfondie qui faisait apparaître une méthémoglobinisation, phénomène déjà connu et qui montrait en plus que la méthémoglobine ainsi formée est différente des méthémoglobines obtenues par voie chimique. Cette différence est confirmée par l'étude de la mobilité électrophorétique, de la résistance à la dénaturation alcaline, du comportement des désoxyhémoglobines obtenues par réduction de la méthémoglobine UV et par réduction des méthémoglobines classiques et de la labilité de la liaison hème-globine.

Il importait alors de préciser à quel niveau de la molécule se situaient les différences entre ces deux types de méthémoglobines. Pour cela, l'hématine et la globine préalablement isolées ont été irradiées ; du point de vue spectral, l'irradiation est sans effet sur l'hématine, alors qu'elle entraîne une modification du spectre de la globine.

Ces résultats nous orientent vers la recherche des modifications de la méthémoglobine UV dans sa fraction protéique, mais qui cependant semblent ne pas devoir être sans rapport avec le groupement prosthétique puisqu'il y a anomalie spectrale dans la région du visible ; l'étude de la labilité de la liaison hème-globine précise l'hypothèse de l'existence d'une modification dans la région des chaînes polypeptidiques proches de l'hème.

On est ainsi arrivé à rechercher une altération éventuelle des groupements thiol dont certains (ceux qui sont immédiatement réactifs), sont adjacents à l'histidine proximale reliée au fer de l'hème. Effectivement, il y a diminution du taux de ces groupements thiol réactifs dans la méthémoglobine UV. Par contre, les groupements thiol **non réactifs** situés au sein de la molécule ne sont pas modifiés par irradiation.

Etant donné que les groupements thiol immédiatement réactifs ont été impliqués par divers auteurs dans les phénomènes d'oxygénation, la diminution de leur taux dans la méthémoglobine UV est rapprochée de la difficulté constatée à revenir à l'oxyhémoglobine à partir de la méthémoglobine UV.

Quant aux groupements thiol non réactifs, puisque sous l'effet des rayons UV ils paraissent ne pas subir de modification et qu'ils sont situés à l'intérieur des chaînes polypeptidiques, il semble probable qu'il n'y ait pas ouverture de la molécule d'hémoglobine avec une élongation semblable à ce qui se produit dans le cas de la sérum-albumine irradiée, ce qui confirme l'absence de variation de viscosité.

Les quelques caractères distinctifs du composé d'irradiation de l'hémoglobine sous sa forme oxydée en méthémoglobine et sous sa forme réduite en désoxyhémoglobine, ne sont pas sans rappeler certaines propriétés caractéristiques d'hémoglobines modifiées, en particulier les hémoglobines M ; d'après les modifications connues de ces divers types d'hémoglobines, nous avons essayé d'émettre l'hypothèse d'une interprétation des "anomalies" de la méthémoglobine UV.

N.B. - Nous désignons sous le terme de méthémoglobine UV le composé d'irradiation de l'oxyhémoglobine.

...the

... ..

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

TECHNIQUES D'ETUDES

A - PREPARATION DES SOLUTIONS D'HEMOGLOBINE.

1°) Solutions d'oxyhémoglobine.

Les globules rouges séparés du plasma par centrifugation du sang recueilli sur oxalate de potassium sont lavés 3 fois avec une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1000 et une fois avec une solution de chlorure de sodium à 12 p. 1000. Un volume de globules est additionné de 4 volumes d'eau bidistillée et 1 volume de toluène. Les stromas sont éliminés par centrifugation de 15 minutes à 20 000 tours/minute. Toutes les opérations sont effectuées à une température voisine de + 4°C. Les solutions sont utilisées dans les 10 jours qui suivent la préparation.

2°) Solutions de méthémoglobines "classiques".

Nous avons préparé des solutions de méthémoglobine par différents modes d'oxydation chimique douce de l'oxyhémoglobine : addition de ferricyanure de potassium, de nitrite de potassium et auto-oxydation. Nous les désignerons respectivement sous les termes de méthémoglobine "ferricyanure", méthémoglobine "nitrite" et méthémoglobine auto-oxydée.

a) méthémoglobine "ferricyanure".

Selon les observations de MIRSKY et ANSCN (1935-36), à pH inférieur à 7, le ferricyanure n'oxyde que le fer de l'hème tandis qu'entre pH 7 et 9,5 il oxyde progressivement jusqu'à 4 des 6 groupements SH de l'hémoglobine humaine (RIGGS et coll. 1956). Nous avons donc préparé la méthémoglobine "ferricyanure" par addition de ferricyanure de potassium à un pH voisin de 7, quoique nous ayons vérifié qu'entre pH 7 et 9 les modifications de la fraction globine signalées par les auteurs n'entraînent aucune modification spectrale de la forme acide de la

méthémoglobine préparée à ces pH. La solution d'oxyhémoglobine est additionnée d'une solution concentrée de ferricyanure de potassium à raison de 6 molécules de ferricyanure pour une molécule d'hémoglobine. Après contact de quelques minutes à 30°C, elle est dialysée à 4°C pendant 20 heures contre de l'eau distillée changée plusieurs fois afin d'éliminer le ferricyanure de potassium. Toutefois, selon HOLDEN (1936), il est impossible de débarrasser totalement la solution de la présence de ferricyanure.

b) méthémoglobine "nitrite".

Nous avons tenu compte des observations de ASSENDELFT et ZIJLSTRA (1965) montrant qu'on doit ajouter à l'oxyhémoglobine une quantité équimoléculaire de NC_2K qu'on ne doit pas dépasser pour obtenir le spectre typique de la méthémoglobine.

c) méthémoglobine auto-oxydée.

Elle a été préparée selon le procédé de CORYELL et PAULING (1937) : l'oxyhémoglobine fraîchement préparée est additionnée d'acide lactique 6 N pour l'amener à pH 4,9 - 5,0 puis laissée à température du laboratoire pendant 2 ou 3 jours pour obtenir une oxydation complète, ramenée à pH 7 avec de la soude N/2 et centrifugée pour éliminer la protéine dénaturée pendant l'acidification.

B - PREPARATION DES SOLUTIONS D'ALBUMINE.

Nous avons utilisé la méthode de précipitation par le sulfate d'ammonium (J. J. PEREZ, 1954).

Les globulines sont précipitées par addition au plasma d'une solution saturée neutre de sulfate d'ammonium de façon à obtenir une concentration finale de sulfate d'ammonium égale à la demi-saturation. Après repos d'au moins 30 mn à la chambre froide, on sépare par centrifugation

les globulines précipitées en recueillant le liquide surnageant qu'on filtre jusqu'à limpidité absolue. On y ajoute ensuite en agitant un volume de solution saturée de sulfate d'ammonium suffisant pour obtenir un louche persistant ; le pH est amené à 3,8 - 4 par addition d'acide sulfurique 0,2 N. Après centrifugation, le liquide surnageant est éliminé et le culot de centrifugation dissout dans le minimum d'eau en rétablissant la neutralité par de l'ammoniaque diluée. La solution ainsi obtenue est dialysée en sac de cellophane jusqu'à ce qu'on ne décèle plus d'ions NH_4^+ dans le dialysat (par le réactif de Nessler). La solution est concentrée alors dans un courant d'air froid. La concentration est déterminée par dosage d'azote après Kjeldhalisation.

Une partie de l'expérimentation a été réalisée directement sur des solutions fraîchement préparées qui se conservent à 4°C pendant une quinzaine de jours ou à partir d'albumine lyophilisée.

C - SOURCE DE RAYONNEMENT ULTRA-VIOLET.

Dans nos premières expériences, la source de rayonnement ultra-violet était une lampe à vapeur de mercure haute tension (5000 volts, 100 mA), basse pression, dont le maximum d'énergie rayonnée se situe à 253,7 m μ . Un système de ventilation permettait d'éliminer l'ozone formé à partir de l'oxygène de l'air.

Par la suite, et pour la majeure partie de nos expérimentations, nous avons utilisé des tubes germicides. La quantité de mercure est réduite de telle façon que la pression de la vapeur n'excède pas 10^{-4} atmosphère. La lampe germicide émet à peu près exclusivement des UV de 253,7 m μ et quelques radiations visibles et infra-rouges (fig. 1). Il y a émission de la radiation 184,9 m μ qui entraîne un dégagement d'ozone ; elle traverse les brûleurs de quartz mais on l'arrête au moyen d'un

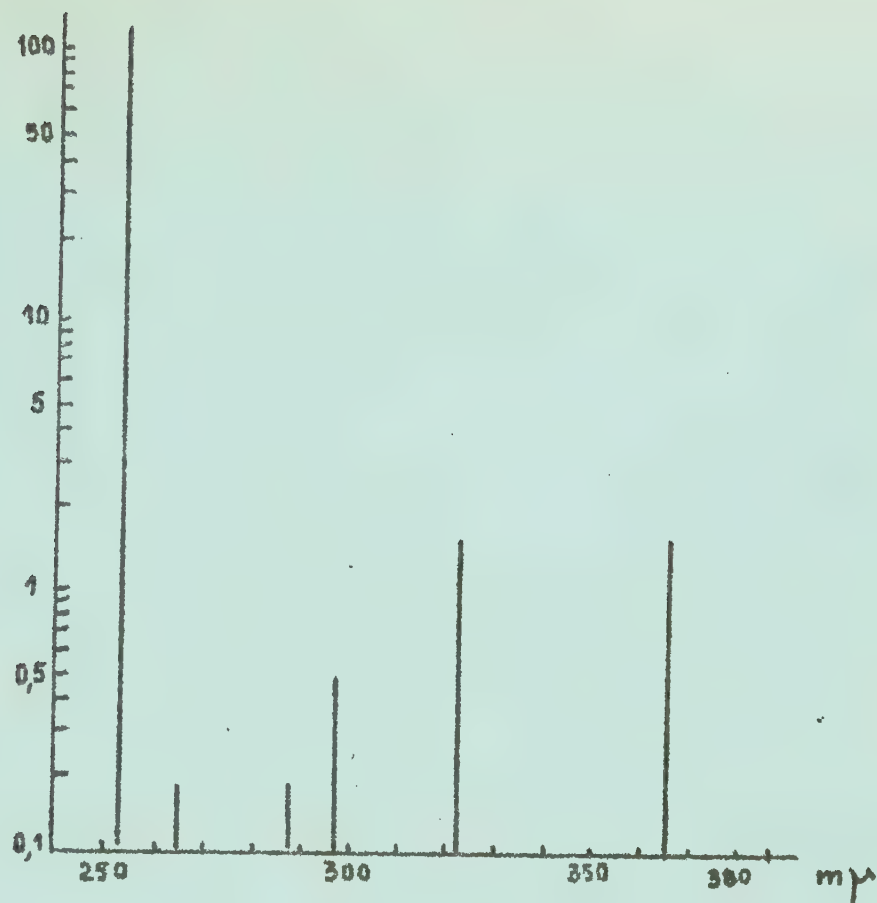


Figure 1

Spectre d'émission des tubes germicides

(valeurs relatives en p. 100 de la valeur à 253,7 mμ)

verre spécial laissant passer 80 à 90 % du 253,7 m μ et quelques radiations visibles et infra-rouges (fig. 1).

Le rendement supérieur de cette lampe évite ainsi de trop longues durées d'irradiation et surtout sa très faible émission dans l'infra-rouge supprime l'échauffement de la préparation.

D - DISPOSITIF D'IRRADIATION.

Un dispositif spécial (fig. 2) nous a permis d'irradier les solutions à l'intérieur d'une cuve étanche à double paroi permettant une circulation d'eau ou d'alcool à température constante, les tubes germicides étant fixés sous le couvercle de cette cuve. Les solutions sont irradiées dans des capsules identiques de 3 cm de diamètre sous une épaisseur de 2 mm, à une distance fixe (19 cm) des tubes germicides.

Les solutions de protéine irradiées à l'air libre ont été ramenées toujours à leur volume initial pour compenser l'évaporation survenue pendant l'irradiation.

L'irradiation a été poursuivie pendant des durées variables, jamais au delà de l'apparition de flocculat qui finit par se produire si l'irradiation est très prolongée.

E - MESURES SPECTRALES.

Elles ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre enregistreur Beckman DK 2, à double faisceau.

CUE POUR IRRADIATION ULTRA-VIOLETTE .

A'B'. CIRCULATION EAU OU ALCOOL A T° CONSTANCE

AB. ARRIVEE DEPART DU GAZ

3 . 2 TUBES U.V. TG 16

2 . JOINT ETANCHE

1 . PARI ISOLANTE

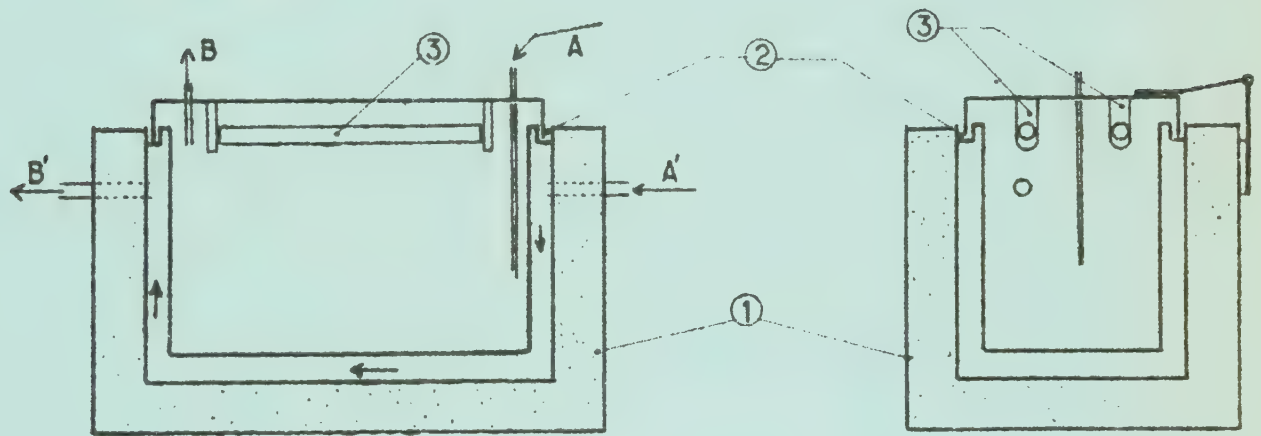


Figure 2

CHAPITRE I

EFFETS DE L'IRRADIATION UV SUR L'OXYHEMOGLOBINE

Compte tenu des résultats connus sur les effets de l'irradiation ultra-violette des albumines et protéines analogues, effets qui se traduisent notamment par d'importantes modifications structurales, on a abordé le problème de l'irradiation ultra-violette de l'hémoglobine. Parmi les tests possibles, un des plus simples est l'étude des variations de viscosité dont on rappelle qu'elles sont essentielles pour les albumines.

D'autre part, le fait que l'irradiation ultra-violette s'accompagne d'une modification de coloration, a incité à entreprendre une étude spectrophotométrique approfondie qui met en évidence un phénomène de méthémoglobinisation et donne quelques caractéristiques de la réaction.

I. - VISCOSITE.

A - Introduction.

Parmi toutes les méthodes physico-chimiques mises en oeuvre pour étudier la dénaturation des protéines, la viscosimétrie peut apporter des informations sur les changements de forme, de volume et de rigidité des molécules protéiques car la viscosité dépend des dimensions, de la configuration et du degré de solvation des macromolécules dissoutes.

Différents auteurs : A. D. Mc LAREN and D. SHUGAR (1964), MAJDANOV A. P., PELYKH MAKARENKO (1961), VINCZE, RIES, TANKA (1961) ont signalé et étudié les modifications de viscosité

des protéines sériques sous l'effet des rayonnements ultra-violets. L'hémoglobine se comporte-t-elle comme ces protéines ? Nous avons comparé l'effet des rayons ultra-violets sur la sérum-albumine : protéine dont on sait qu'elle subit une augmentation notable de viscosité, et sur l'hémoglobine, en les plaçant dans des conditions expérimentales identiques.

Pour les albumines, l'expérimentation a été réalisée sur des solutions fraîchement préparées, ou à partir d'albumine lyophilisée ; nous avons vérifié que leur comportement est le même vis à vis de l'irradiation ultra-violette et que la lyophilisation n'apporte aucune modification du coefficient de viscosité ni de la courbe de relargage.

Quant aux hémoglobines, étant donné que la dessiccation des solutions d'oxyhémoglobine apporte des modifications très importantes que nous signalons par la suite, et quoiqu'elle n'ait pas d'influence sur la viscosité, nous ne donnons que les résultats se rapportant à des solutions fraîchement préparées.

On a mesuré la viscosité relative par rapport à l'eau avec un microviscosimètre d'Oswald.

B - Effets de l'irradiation sur la viscosité de solutions d'oxyhémoglobine et de sérum-albumine.

Les résultats suivants ont été obtenus par irradiation à 25°C sous la lampe à vapeur de mercure haute tension, basse pression, de solutions d'albumine et d'oxyhémoglobine à 10 g p. 100 ml appartenant à différentes espèces animales.

Sérum-albumines.

La viscosité η_r de solutions d'albumine augmente par irradiation (fig. 3 - courbe 1) et $\log \eta_r$ est une fonction linéaire du temps (fig. 3 - courbe 2).

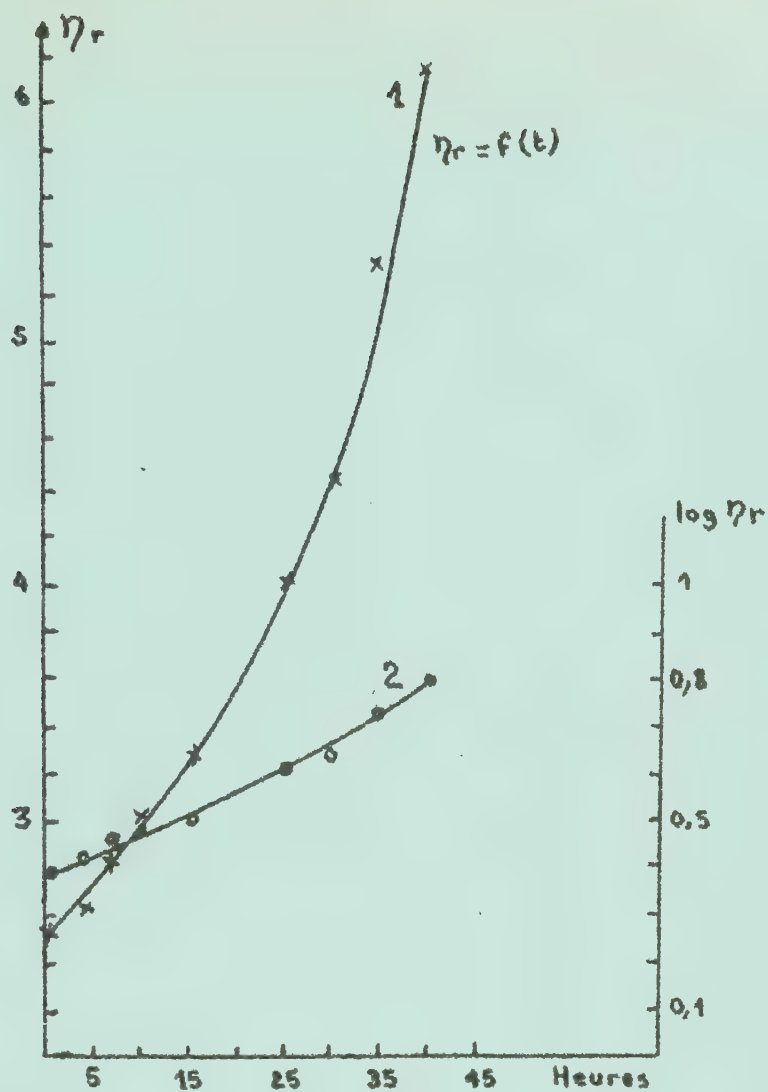


Figure 3

Variation de la viscosité de solution de sérum albumine
de cheval en fonction de la durée d'irradiation

Concentration de la solution : 10 g p. 100 ml

Température d'irradiation : 25°C

$$\log \eta_r = a + bt$$

η_r varie donc selon une loi exponentielle

$$\eta_r = A e^{Kt}$$

$$A = e^{2,3a}$$

$$K = 2,3b$$

Pour des albumines appartenant à différentes espèces animales, l'augmentation de viscosité est du même ordre :

Pour l'albumine de boeuf $\eta_r = 1,73 \times e^{0,018 t}$

Pour l'albumine de cheval $\eta_r = 2,34 \times e^{0,023 t}$

Pour l'albumine humaine $\eta_r = 1,66 \times e^{0,023 t}$

Pour l'albumine de mouton $\eta_r = 1,75 \times e^{0,018 t}$

Hémoglobines.

L'irradiation, si prolongée soit-elle, n'entraîne pratiquement pas de modification de la viscosité des solutions d'hémoglobine, quelle que soit l'espèce animale considérée.

Hémoglobine humaine adulte : Durée d'irradiation	η_r
0	1,34
5 h	1,36
10 h	1,37
20 h	1,40
30 h	1,41

Hémoglobine humaine foetale : Une irradiation de 30 heures fait varier η_r de la valeur 1,40 à 1,45.

Hémoglobine de cheval : η_r passe de la valeur 1,59 à 1,58 après 30 heures d'irradiation.

Hémoglobine de mouton, hémoglobine de boeuf : Pas de variation de viscosité.

C - Influence de divers facteurs.

1°) pH.

L'irradiation est réalisée sous tubes germicides.

- Sérum-albumines.

L'acidification entraîne spontanément, en absence d'irradiation, un accroissement notable du coefficient de viscosité (fig. 4 - courbe 1), résultat signalé déjà (JCLY M. 1965).

L'irradiation augmente considérablement ce phénomène (fig. 4 - courbe 1).

A pH alcalin, au contraire, le coefficient de viscosité varie très peu (fig. 4 - courbe 2).

- Hémoglobines.

L'acidification entraîne par elle-même une augmentation de la viscosité de la solution d'hémoglobine. Pour une solution d'hémoglobine de cheval à 4 g p. 100 ml, à son pH initial 7,4 $\eta_r = 1,09$ pour la même solution, amenée par addition de HCl N/5 à pH 3,5 $\eta_r = 1,67$. Mais l'irradiation de cette solution acide n'entraîne pas de variation de sa viscosité.

Par simple alcalinisation, il y a une très faible augmentation du coefficient de viscosité relative ; ex. : en ce qui concerne une solution d'hémoglobine de cheval à 4 g p. 100 ml : $\eta_r = 1,09$ à pH 7,4
 $\eta_r = 1,20$ à pH 10,9

Mais on n'observe aucune modification de la viscosité de la solution alcaline par irradiation, même après plusieurs heures d'exposition sous la lampe.

Etant donné que par irradiation l'oxyhémoglobine se transforme en méthémoglobine (comme nous l'étudierons plus loin), nous avons comparé dans des conditions identiques de concentration et de pH, le coefficient de viscosité de la méthémoglobine formée par irradiation, et celui des méthémoglobines classiques préparées par autooxydation d'oxyhémoglobine, ou addition de ferricyanure, ou de nitrite de potassium ; nous n'avons relevé aucune différence.

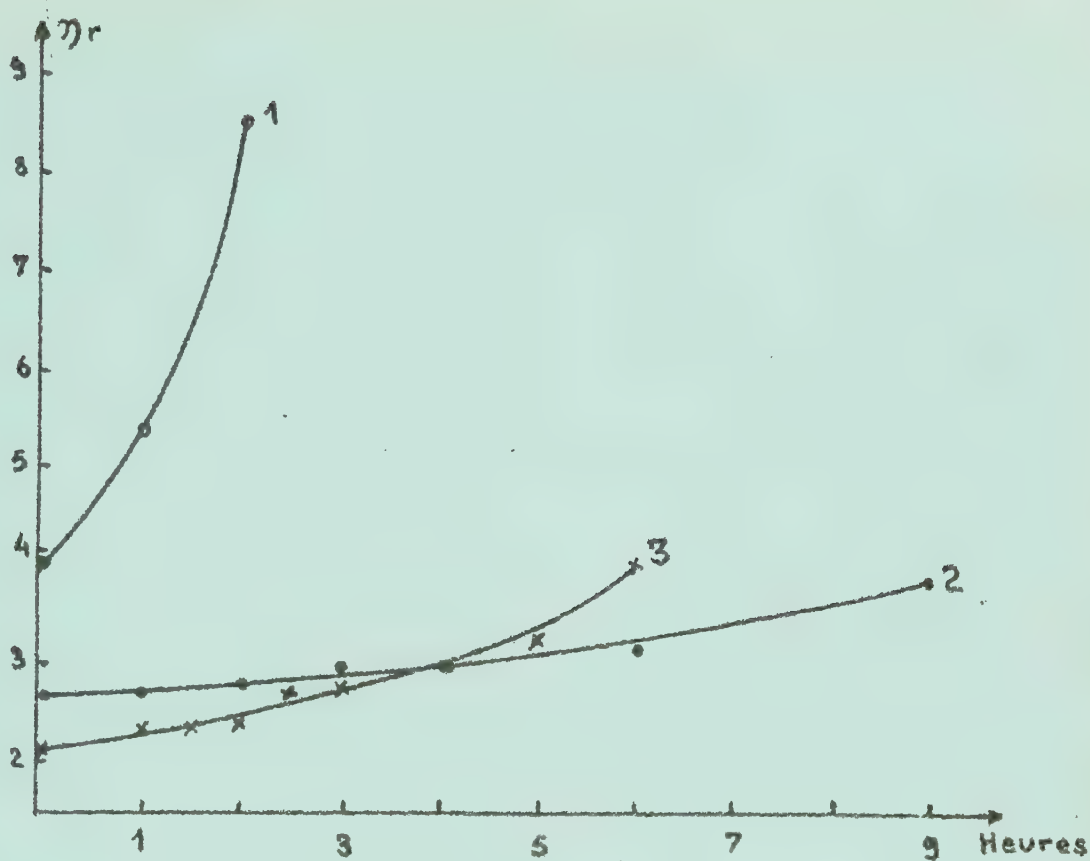


Figure 4

Variation de la viscosité de solution de sérum-albumine
en fonction de la durée d'irradiation.

Sérum albumine de boeuf

Concentration de la solution : 8 g p. 100 ml

Température d'irradiation : 25°C

1 - à pH 3,2

2 - à pH 10,7

3 - à pH 6,7

D'autre part, si l'irradiation n'entraîne par elle-même aucune variation de viscosité, elle ne modifie pas non plus le comportement de l'hémoglobine vis à vis de facteurs qui provoquent une augmentation de viscosité en relation avec un changement de configuration de la molécule. En effet, nous avons repris l'expérimentation de TANFORD (1957) sur les modifications de viscosité des solutions de méthémoglobine par acidification en l'appliquant comparativement à la solution irradiée et aux méthémoglobines classiques : l'augmentation de viscosité est la même dans tous les cas.

Exemple : Méthémoglobine de mouton obtenue par irradiation, et oxyhémoglobine de mouton transformée en méthémoglobine par addition de NO_2K ; concentration des solutions : 5 g p. 100 ml. A pH 7,2 les coefficients de viscosité de ces deux solutions sont identiques et égaux à 1,18. Ces deux solutions sont placées à pH 3,5 en tampon citrate M/20 pendant 15 minutes : Les coefficients de viscosité augmentent également dans les 2 cas jusqu'à la valeur 2.

2°) Température.

L'irradiation est réalisée sous tubes germicides en utilisant le dispositif déjà décrit (p. 6).

- Sérum-albumine.

L'augmentation de viscosité est nettement influencée par la température ; elle correspond vraisemblablement à au moins deux phénomènes : l'un photochimique indépendant de la température, l'autre essentiellement fonction de la température (étape sombre) et que nous avons essayé de dissocier :

Par centrifugation à 40.000 tours/minute des solutions irradiées, il apparaît à partir de 1 h 1/2 d'irradiation un dépôt formé par un gel dont l'importance augmente par la suite quand l'irradiation se poursuit et ce, beaucoup plus vite à 20°C qu'à 0°C (fig. 5 A et B - courbe 2) tandis

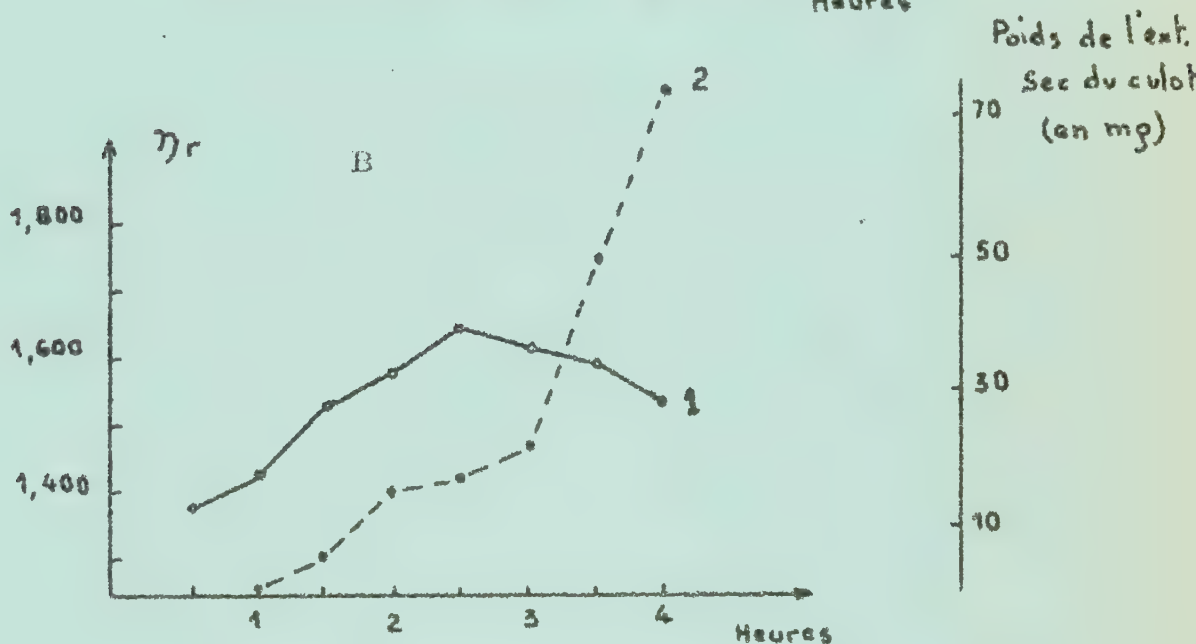
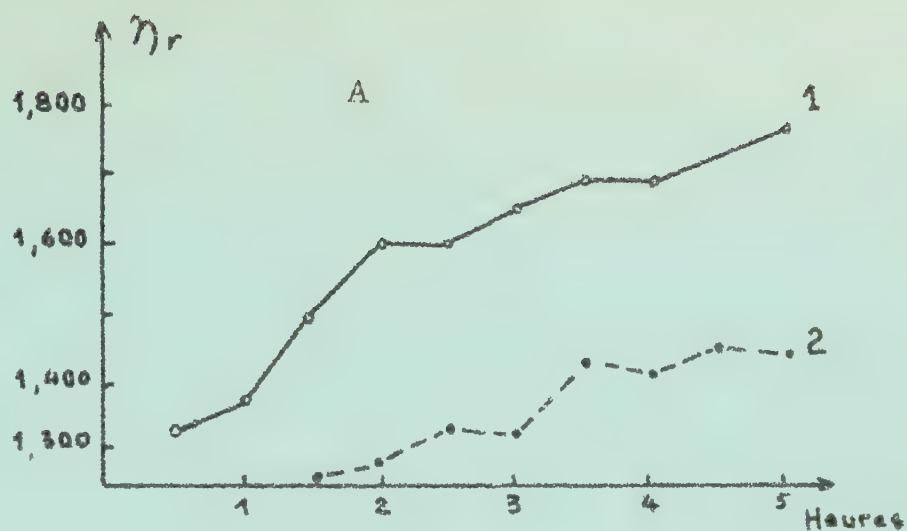


Figure 5

Effet de la température sur les modifications de viscosité de solution de sérum albumine en fonction de la durée d'irradiation.

Solution de sérum albumine de mouton
Concentration : 6,2 g p. 100 ml

- 1 - Viscosité de la phase surnageant le culot de la solution de sérum-albumine après centrifugation à 40.000 tours/minute.
- 2 - Poids de l'extrait sec du culot.

A - Température d'irradiation : 0°C
B - Température d'irradiation : 20°C

que la viscosité de la phase surnageante continue d'augmenter à 0°C et qu'elle diminue quand l'irradiation se fait à 20°C (fig. 5 A et B - courbe 1).

- Hémoglobines.

L'irradiation à 0°, 22° et 40°C de solution d'oxyhémoglobine appartenant à différentes espèces animales n'apporte aucune modification au coefficient de viscosité relative de ces solutions.

D - Essai d'interprétation.

1°) L'augmentation du coefficient de viscosité relative des solutions d'albumine sous l'effet des rayons ultra-violets, peut être interprétée comme étant due à la transformation progressive de la structure globulaire en structure asymétrique ; C. BENEZECH et nous-même (1961) avons montré que le coefficient de viscosité des solutions d'albumine irradiées augmente selon une loi exponentielle. Or, on sait que, selon ARRHENIUS, les solutions de macromolécules linéaires ont un coefficient de viscosité qui est fonction exponentielle de leur concentration, ce qui n'est pas le cas pour les protéines globulaires.

L'irradiation des albumines transformerait donc la structure globulaire en structure asymétrique, mais l'augmentation de viscosité pourrait être due aussi à une augmentation de l'hydratation (puisque l'on connaît les relations entre hydratation et viscosité des protéines), ce qui devrait entraîner une augmentation de la stabilité des protéines irradiées par rapport aux protéines natives. Or, par l'étude de nombreuses courbes de relargage et de la stabilité à la ~~haute~~ ^{large} bande de pH, nous avons établi que l'aptitude à la floculation des solutions d'albumine est considérablement augmentée par irradiation. Par conséquent, l'augmentation du coefficient de viscosité et la diminution de stabilité sont des faits qui plaident en faveur d'une transformation structurale.

D'autre part, J. LLORY (1960) montre qu'une solution de sérum-albumine peut acquérir, par irradiation ultra-violette, la propriété d'agglomérer les érythrocytes et de ce fait permet leur sédimentation dans cette solution. Or, on sait que seules les macromolécules à structure linéaire sont susceptibles d'être adsorbées par les hématies en permettant ainsi leur sédimentation.

2°) Il existe une divergence complète de comportement des sérum-albumines et des hémoglobines vis à vis de l'irradiation ultra-violette ; cependant, il s'agit de deux types de molécules globulaires qui peuvent subir l'une et l'autre sous l'effet d'un même facteur des modifications de viscosité comparables. Par acidification par exemple, il y a accroissement très notable de la viscosité de la sérum-albumine correspondant à la transition entre la forme native condensée et une forme dilatée. Or, on sait que la méthémoglobine subit, à pH inférieur à 4, un changement de configuration très important (STEINHARD et ZAISER 1953) qui s'accompagne d'une augmentation de viscosité (TANFORD 1957) et dont ces auteurs pensent qu'il consiste en une expansion de la molécule comparable à celle qui est observée sur la sérum-albumine.

En ce qui concerne l'effet des rayons ultra-violets sur la sérum-albumine, on sait que la structure tertiaire de cette protéine est stabilisée par une sorte de charpente constituée de 17 ponts disulfure dont différents auteurs (ENGELHARD et EIKENBERG cités par Mac LAREN 1963) ont observé la photolyse par les rayons ultra-violets. SUSCILLON et SIFFOINTE (1966) montrent que la modification structurale de la sérum-albumine irradiée implique une destruction partielle ou totale des ponts disulfure.

En ce qui concerne l'hémoglobine, elle ne possède pas de ponts disulfure (ALLISON et CECIL 1958), mais les groupements -SH non immédiatement réactifs seraient impliqués selon CECIL et

SNOW (1961) dans quelques formes de liaison intra-chaîne de nature chimique inconnue qui, avec les ponts hydrogène, stabilise la structure des chaînes polypeptidiques. Or, nous verrons plus loin qu'à l'inverse des groupements disulfure de la sérum-albumine, les groupements -SH non immédiatement réactifs de l'hémoglobine ne sont pas altérés par les rayons ultra-violet.

II. - SPECTRES D'ABSORPTION.

A - Mise en évidence de la formation de méthémoglobine.

Si on soumet une solution d'oxyhémoglobine à l'action du rayonnement ultra-violet, il apparaît un brunissement de la solution, et dans les conditions où l'irradiation est assez longue (concentration de la solution : 1 g p. 100 ml, pH 7, température d'irradiation : 12°C, durée d'irradiation : 3 heures), on constate qu'à la différence de l'oxyhémoglobine pour laquelle l'absorption de la lumière est indépendante du pH, le spectre du composé formé par irradiation varie avec le pH.

Rapports	méthémoglobine "ferricyanure"	méthémoglobine UV
K 576/K 560	1,09	1,07
K 623/K 560	0,38	0,42
K 540/K 560	1,23	1,23
K 576/K 590	1,22	1,37

TABLEAU I

Valeurs des rapports d'absorption pour la méthémoglobine "ferricyanure" et l'hémoglobine irradiée, obtenus en déterminant à pH 9 le rapport des densités optiques de solutions à 0,1 g p. 100 ml sous 1 cm d'épaisseur.

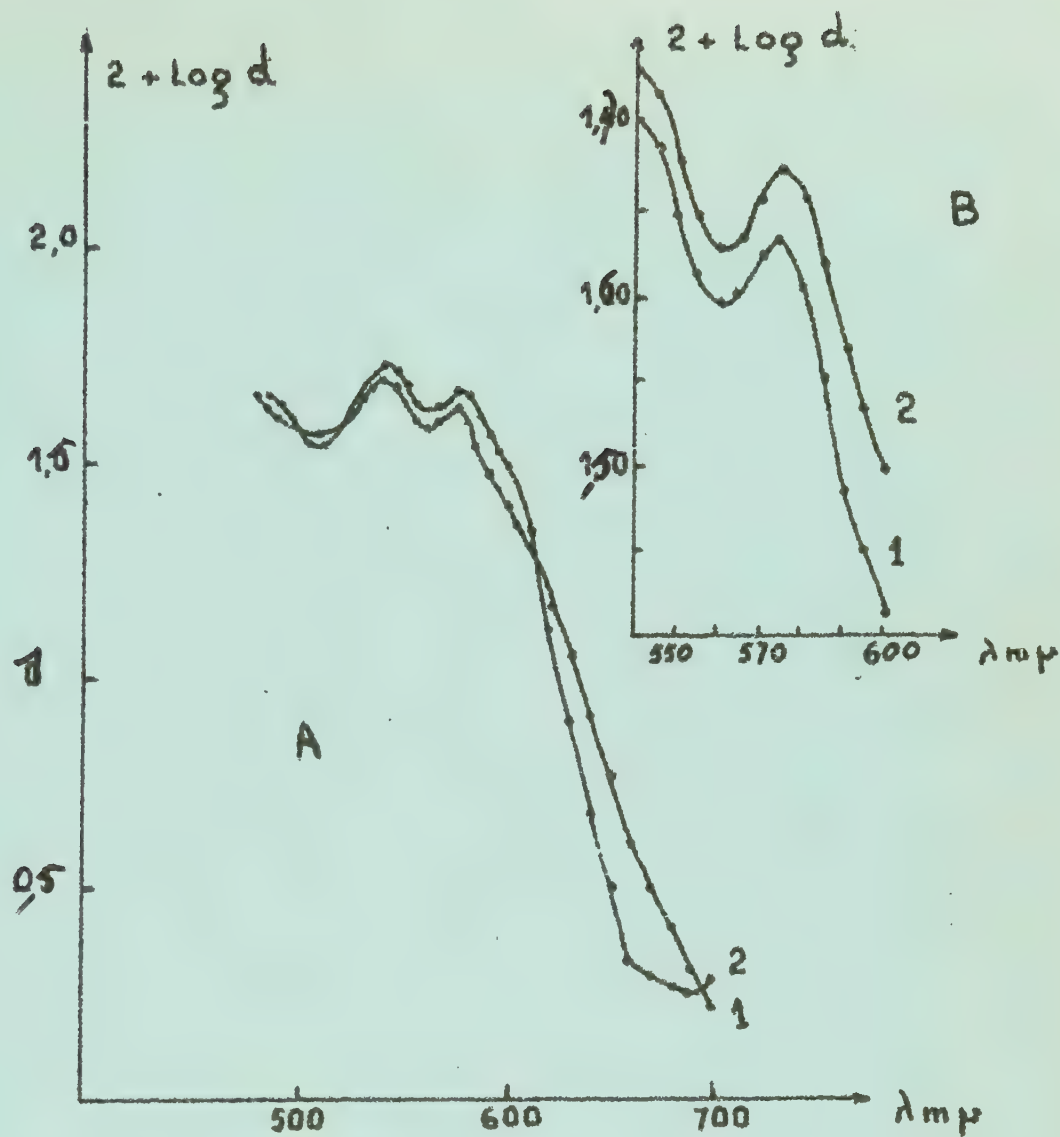


Figure 6

A - Courbes d'absorption caractéristique à pH 9

1) Méthémoglobine "ferricyanure"

2) Méthémoglobine UV

(Oxyhémoglobine à 1 g p. 100 ml, pH 7

température d'irradiation : 12°C

durée d'irradiation : 3 heures

B - Détail de la fig. A

On porte en ordonnées $2 + \log d$ au lieu de $\log d$ pour éviter des nombres négatifs.

1°) Spectre en milieu alcalin.

En dilution ammoniacale, le spectre de la solution irradiée présente deux bandes d'absorption à 540 et 576 m μ ; le maximum de la bande de Soret qui, pour l'oxyhémoglobine se situe à 414 m μ , est déplacé à 404 m μ . La similitude des formes alcalines du composé d'irradiation et de la méthémoglobine "ferricyanure" est confirmée en comparant leur courbe d'absorption caractéristique : $\log d = f(\lambda)$; on sait que la forme de ces courbes est rigoureusement indépendante de la concentration, ce qui permet de mieux préciser la position des maxima ; en effet, quand on établit la courbe $d = f(\lambda)$, sa forme varie avec la concentration et les sommets sont imprécis quand ces concentrations sont faibles. La figure 6 montre que la courbe d'absorption caractéristique de la solution irradiée et celle de la méthémoglobine "ferricyanure" sont pratiquement superposables.

La détermination de plusieurs quotients caractéristiques des coefficients d'extinction permet de constater que leurs valeurs sont pratiquement les mêmes, qu'il s'agisse de méthémoglobine "ferricyanure" ou d'hémoglobine irradiée (Tableau I).

2°) Spectre en milieu acide.

La courbe d'absorption caractéristique de la même solution irradiée établie en tampon phosphate M/30 pH 5,28 présente en grande partie les caractères du spectre de la forme acide de la méthémoglobine "ferricyanure" (fig. 7).

3°) Réduction du composé d'irradiation.

Elle se fait comme pour la méthémoglobine par addition d'hydrosulfite de sodium ; la bande d'adsorption à 630 m μ disparaît pratiquement tandis qu'apparaît une bande à 556 m μ caractéristique de la désoxyhémoglobine.

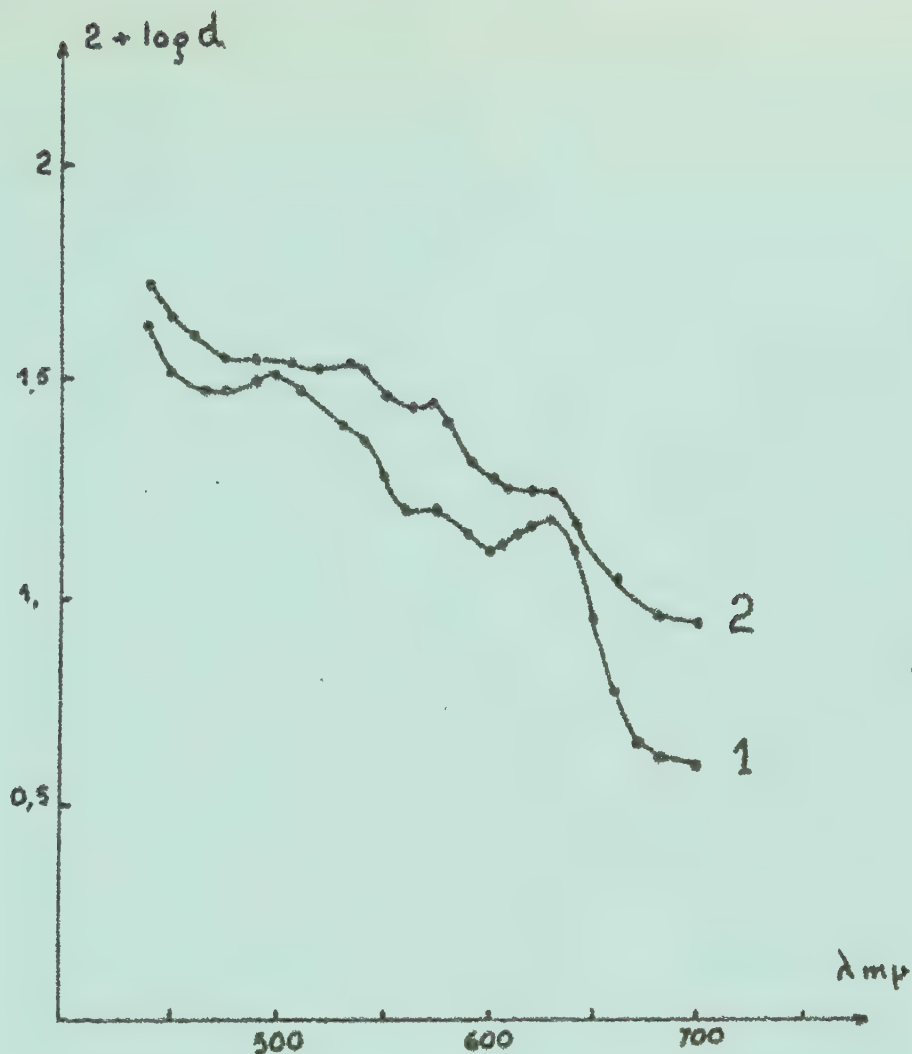


Figure 7

Courbes d'absorption caractéristique à pH 5,28

1) Méthémoglobine "ferricyanure"

2) Méthémoglobine UV

(Oxyhémoglobine à 1 g p. 100 ml, pH 7

température d'irradiation : 12°C

durée d'irradiation : 3 heures)

On porte en ordonnées $2 + \log d$ au lieu de $\log d$ pour éviter des nombres négatifs.

4*) Addition de CNK.

La bande à 630 m μ disparaît par addition de CNK à pH 7, avec formation d'une bande unique à 540 m μ caractéristique de la cyan-méthémoglobine.

Les tests de réduction et de formation de cyanméthémoglobine écartent l'hypothèse de la présence de composés d'oxydation de l'hémoglobine autres que la méthémoglobine, tel la choléglobine dont la bande d'absorption dans la région orangée du spectre à 637 m μ ne disparaît pas en présence d'hydrosulfite de sodium ou de cyanure de potassium.

Il s'agit donc bien vraisemblablement d'une transformation en méthémoglobine de l'oxyhémoglobine sous l'effet de l'irradiation. C'est d'ailleurs là un phénomène observé par différents auteurs sur les solutions d'hémoglobine soumises à l'action des rayons ultra-violets, des rayons X ou des rayons γ (FRICKE et PETERSEN, 1927 - LASER, 1955 - KUMTA et TAPPEL, 1961 - AFIFI et coll., 1960), ou sur des solutions de myoglobine exposées aux rayons γ (DUANE BROWN et ARGIROUDI AKOYUNOGLU 1964).

B - Caractéristiques de la réaction.

1*) Méthode d'étude.

C'est en nous appuyant sur l'identité spectrale en milieu alcalin du composé d'irradiation avec la méthémoglobine que nous avons évalué quantitativement la transformation de l'oxyhémoglobine irradiée par la méthode des rapports d'absorption.

Le dosage de la méthémoglobine dans un mélange méthémoglobine-oxyhémoglobine est basé sur le fait que le quotient K 576/K 590 varie entre 3,84 pour l'oxyhémoglobine pure et 1,25 pour la méthémoglobine alcaline ; selon HEILMEYER la marge d'erreur est

de 3 p. 100 seulement. Les mesures sont donc effectuées après dilution dans de l'ammoniaque à 0,4 p. 100 des solutions d'hémoglobine irradiées, ce qui permet de réaliser un pH auquel toute la méthémoglobine est sous forme alcaline. On constate que la transformation en méthémoglobine de l'oxyhémoglobine irradiée peut atteindre un taux voisin de 100 pour 100 suivant les conditions d'irradiation (durée d'irradiation, pH, température et concentration des solutions).

Selon AFIFI (1961) qui dose la méthémoglobine formée sous l'effet des rayons X en suivant la disparition de l'oxyhémoglobine à 575 m μ et l'apparition de la méthémoglobine à 637 m μ , le taux maximum de méthémoglobine est de 75 p. 100.

La bande d'absorption à 637 m μ est caractéristique de la forme acide de la méthémoglobine, or nous avons observé (et c'est l'objet d'une étude ultérieure) qu'une solution irradiée dont le spectre est pratiquement identique à pH alcalin à celui de la méthémoglobine "ferricyanure", présente à pH acide des différences spectrales très nettes qui se traduisent précisément par une diminution de l'absorption à 637 m μ . Un dosage de la méthémoglobine basé sur l'absorption à 637 m μ donne donc des résultats inférieurs aux nôtres.

Signalons enfin qu'en soumettant une solution d'oxyhémoglobine à l'action des rayons X, nous avons observé nous-même, par notre méthode de dosage, une transformation de plus de 75 p. 100 de méthémoglobine qui présente les mêmes caractères spectraux que le composé formé par irradiation ultra-violette.

2*) Cinétique.

Conditions expérimentales : oxyhémoglobine humaine concentration 2 g p. 100 ml, pH 6,1 ; température d'irradiation : 19°C.

Nous avons calculé l'équation de la courbe de cinétique de transformation en méthémoglobine en fonction de la durée d'irradiation (fig. 8).

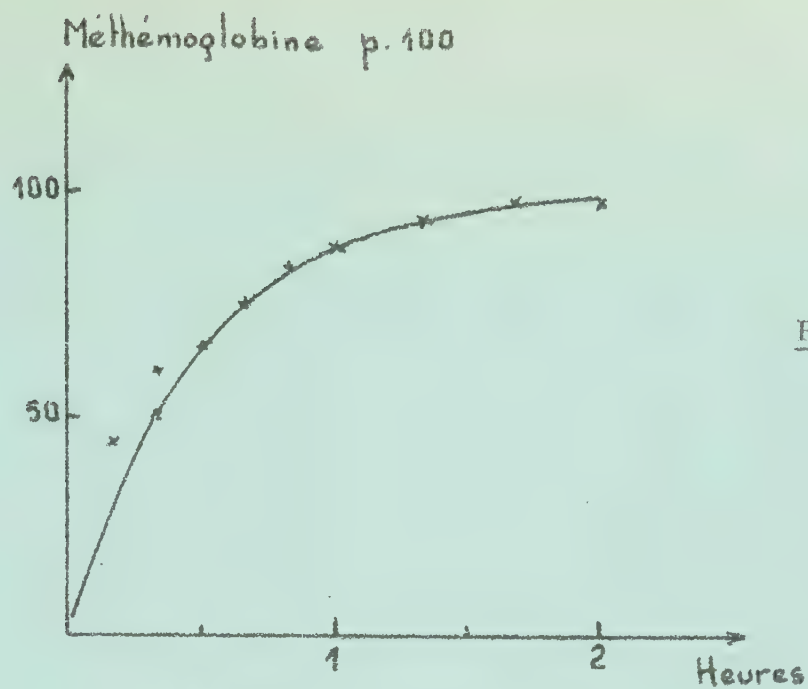


Figure 8

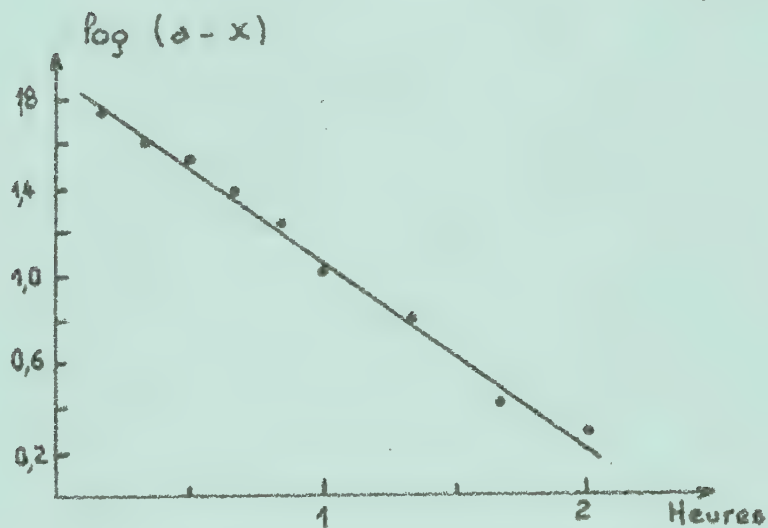


Figure 9

Cinétique de la transformation en méthémoglobine

Solution d'oxyhémoglobine humaine

Concentration : 2 g p. 100 ml

pH : 6,1

Température d'irradiation : 19°C

La courbe représentative des variations de $\log(a - x)$ en fonction du temps est une droite décroissante d'équation $\log(a - x) = 2 - jt$ (fig. 9).

a : pourcentage d'hémoglobine sous forme d'oxyhémoglobine au temps 0
 x : pourcentage d'hémoglobine sous forme de méthémoglobine au temps t .

L'équation générale de la courbe est donc :

$$\% \text{ de méthémoglobine} = 100 (1 - e^{-jt})$$

ce qui permet de calculer une constante de vitesse j caractérisant la méthémoglobinisat ion. Dans le cas précis : $j = 5,9 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$

La constante de vitesse dépend du pH, de la température et de l'atmosphère d'irradiation.

a) Influence du pH d'irradiation.

Des solutions d'oxyhémoglobine humaine à 2 g p. 100 ml sont ajustées aux pH 7 ; 6,1 et 10,1 par addition de soude ou d'acide chlorhydrique et irradiées à 19°C dans les mêmes conditions. Les valeurs de j sont les suivantes :

Irradiation à pH 6,1	$j = 5,9 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$
pH 7	$j = 3,9 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$
pH 10,1	$j = 2,9 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$

L'acidification favorise donc la méthémoglobinisat ion par irradiation ultra-violette comme dans le cas des procédés chimiques ; nos résultats rejoignent ceux d'AFIFI (1961) sur la méthémoglobinisat ion par irradiation.

b) Influence de l'atmosphère.

On compare les effets de l'irradiation en atmosphère d'azote, air et oxygène sur des solutions d'hémoglobine.

Conditions expérimentales : 8 ml de solution d'hémoglobine humaine à 2 g p. 100 ml, pH 7,2 en tampon phosphate M/30 sont irradiés à 4°C dans un tube de quartz de 20 cm de long et 3 cm de diamètre où peut circuler un courant gazeux.

- Irradiation en atmosphère d'azote.

La solution d'oxyhémoglobine est agitée pendant 30 minutes dans un tonomètre sous courant d'azote qui a barboté préalablement dans une solution de sulfite de sodium et qui est débité à 100 cc/mn. La solution d'hémoglobine reste sous courant d'azote pendant toute la durée de l'irradiation, son spectre est enregistré après dilution en tampon phosphate IV / 30, pH 5,30 (où l'on a déjà fait passer un courant d'azote pendant 10 minutes et maintenu sous huile de paraffine).

La constante de vitesse de la réaction $j = 0,3 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$

- Irradiation en présence d'air.

$j = 1,2 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$

- Irradiation en atmosphère d'oxygène.

$j = 1,5 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$

On constate donc qu'une atmosphère d'oxygène favorise la méthémoglobininisation, mais il semblerait que, même en absence d'oxygène il y ait encore transformation en méthémoglobine, ce qui concorderait avec les résultats de divers auteurs sur l'effet de l'irradiation gamma (AFIFI, 1961) et l'effet des rayons X (LASER, 1955) sur l'oxyhémoglobine ; mais un calcul simple permet de se rendre compte que, malgré les précautions que nous avons prises pour priver d'oxygène l'atmosphère d'irradiation, les traces qui inévitablement pouvaient demeurer, étaient suffisantes pour provoquer cette oxydation.

c) Influence de la température.

Si on compare la cinétique de transformation en méthémoglobine de solutions d'oxyhémoglobine humaine à 2 g p. 100 ml, pH 7,2 irradiées à 0°, 22° et 40°C, on constate que la réaction est accélérée par une augmentation de température.

Irradiation à 40°C $j = 6,9 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$

Irradiation à 22°C $j = 4,1 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$

Irradiation à 0°C $j = 2,8 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$

En représentant les variations de $\log j$ en fonction de $1/T$ (fig. 10) (T = température absolue), on obtient approximativement une droite dont la pente est proportionnelle à l'énergie d'activation : μ

Calcul de l'énergie d'activation :

D'après la relation d'ARRHENIUS : $\text{Log } j = A - \mu/RT$

La mesure de l'énergie d'activation se déduit de l'étude de la vitesse de la réaction en fonction de la température :

$$\mu = \frac{\log j - \log j'}{T - T'} \times 2,3 RTT'$$

j et j' étant les constantes de vitesse aux températures T et T'

D'après nos résultats expérimentaux $\mu \approx 3500 \text{ calories/mole}$

La valeur de l'énergie d'activation est donc très faible.

A partir de ces données, il est possible de calculer la variation d'énergie libre d'activation ΔG^* et d'entropie d'activation ΔS^*

$$\Delta G^* = -RT \text{ Log } K^*$$

$$K^* = \frac{(\text{concentration en molécules activées})}{(\text{concentration en molécules normales})}$$

$$j = \frac{KT}{h} K^*$$

K : constante de BOLTZMANN

h : constante de PLANCK

$$\Delta G^* = -RT (\text{Log } j - \text{Log } \frac{KT}{h})$$

A la température de 22°C, d'après nos résultats expérimentaux :

$$\Delta G^* = 21000 \text{ cal/mol}$$

on peut calculer l'enthalpie d'activation :

$$\Delta H^* = \mu - RT = 2900 \text{ cal/mol}$$

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T \Delta S^*$$

$$T \Delta S^* \approx 19000$$

$$\Delta S^* \approx -60 \text{ unités d'entropie (cal/degré/mol)}$$

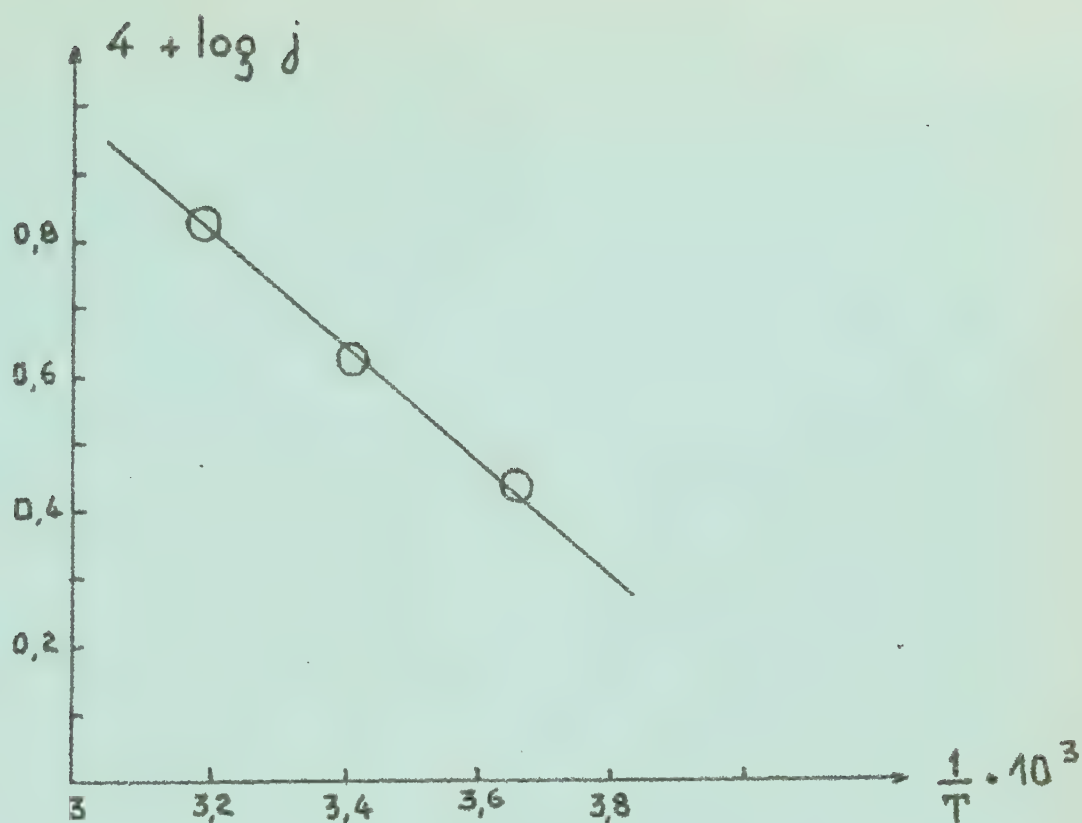


Figure 10

Variation du logarithme de la constante de vitesse
en fonction de l'inverse de la température absolue

Solution d'oxyhémoglobine humaine

Concentration : 2 g p. 100 ml

pH : 7,2

CHAPITRE II

MISE EN EVIDENCE DES DIFFERENCES ENTRE METHEMOGLOBINE OBTENUE PAR IRRADIATION ULTRA-VIOLETTE ET ME- THEMOGLOBINES OBTENUES PAR VOIE CHIMIQUE

Est-ce que le phénomène de méthémoglobinisation que nous venons d'étudier aboutit à la transformation de l'oxyhémoglobine en un composé semblable aux méthémoglobines classiques ?

Cette question est le point de départ d'une étude comparée du composé obtenu par irradiation, que nous désignons sous le terme de méthémoglobine ultra-violette, avec trois types de méthémoglobines obtenues par oxydation chimique douce de l'oxyhémoglobine (addition de nitrite, de ferricyanure de potassium et auto-oxydation), qui fait ressortir des différences de spectre et de quelques propriétés physico-chimiques.

I. - DIFFERENCES SPECTRALES (Etude spectrale en milieu acide)

A - Mise en évidence.

Si les formes alcalines des méthémoglobines classiques et de la méthémoglobine ultra-violette ont, nous l'avons vu, un spectre identique, ce qui a permis le dosage, par contre, en milieu acide apparaissent des différences spectrales peu spectaculaires mais très nettes.

En comparant les courbes d'absorption caractéristique en milieu acide des méthémoglobines humaines obtenues par irradiation et par voie chimique, on constate que :

1°) Les courbes des 3 types de méthémoglobines classiques considérées sont superposables tandis que celle de la méthémoglobine ultra-violettes présente par rapport à ces dernières les différences suivantes (fig. 7) :

- les 2 bandes d'absorption à 540 et 576 m μ sont plus intenses, alors qu'inversement les bandes à 500 et à 630 m μ s'affaiblissent en plateau. Ce phénomène est particulièrement important pour la bande à 630 m μ qui, rappelons le, est fréquemment utilisée dans les dosages de méthémoglobine.

- la bande de Soret est plus faible ; à noter qu'elle garde la même intensité à pH acide et à pH alcalin tandis que dans cette région le coefficient d'extinction de la forme acide de la méthémoglobine "ferricyanure" est plus élevé que celui de la forme alcaline.

2°) Ces différences spectrales entre méthémoglobine ultra-violettes et méthémoglobine "ferricyanure" sont-elles dues à la présence d'oxyhémoglobine non encore transformée dans la solution ? Pour le vérifier :

- Nous avons enregistré le spectre de la solution irradiée (qui contient encore 6 % d'oxyhémoglobine) par différence avec une solution d'oxyhémoglobine à 6 % introduite dans la cuve témoin du spectrophotomètre. Il y a alors simple disparition des bandes à 576 et 540 m μ de la méthémoglobine ultra-violettes.

- L'addition de ferricyanure de potassium à la solution irradiée qui transforme la totalité de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine aboutit au même résultat : la disparition presque complète des bandes à 540 et 576 m μ .

Par conséquent, en éliminant les modifications spectrales que cause la présence d'oxyhémoglobine non transformée dans la solution irradiée, on constate que le spectre de la forme acide de la

méthémoglobine ultra-violette diffère de celui des méthémoglobines classiques par un affaïssement des bandes d'absorption à 500 et 630 m μ .

3°) Irradiation d'oxyhémoglobine de différentes espèces animales.

L'irradiation dans des conditions identiques d'oxyhémoglobine humaine foetale et d'oxyhémoglobine de cheval, de boeuf et de mouton conduit à leur transformation en une méthémoglobine qui présente les mêmes caractéristiques que la méthémoglobine ultra-violette humaine.

B - Caractérisation des anomalies spectrales de la méthémoglobine ultra-violette.

Comme l'absorption à 500 et 630 m μ est plus faible pour la méthémoglobine ultra-violette que pour les méthémoglobines classiques tandis qu'elle est plus importante à 600 m μ , on peut utiliser les rapports d'absorption K 500/K 600 ou K 630/K 600 pour caractériser les différences spectrales entre méthémoglobine ultra-violette et méthémoglobines classiques.

	<u>K 500/K 600</u>	<u>K 630/K 600</u>
méthémoglobine "ferricyanure"	3,20	1,43
méthémoglobine UV	2,7 à 2,3	1,15 à 0,9

Pour la méthémoglobine ultra-violette les valeurs de ces rapports sont plus faibles et dépendent des conditions d'irradiation : pH, température et durée d'irradiation. L'irradiation entraîne une diminution de ces rapports même lorsque la transformation en méthémoglobine est terminée.

C - Cinétique.

Conditions expérimentales : oxyhémoglobine humaine à 1,9 g p. 100 ml en tampon phosphate M/30 ; pH d'irradiation : 5,6 ; température d'irradiation 2°C.

Pour étudier l'évolution des différences spectrales entre méthémoglobine ultra-violette et méthémoglobines classiques qui apparaissent dans la solution d'hémoglobine en cours d'irradiation, on suit les variations des rapports d'absorption K_{630}/K_{600} ou K_{500}/K_{600} en fonction de la durée d'irradiation et on dose simultanément le taux de méthémoglobine qui se forme. D'autre part, on établit une courbe d'étalonnage de la variation des rapports K_{630}/K_{600} et K_{500}/K_{600} en fonction du taux de méthémoglobine pour des mélanges de méthémoglobine "ferricyanure" et d'oxyhémoglobine.

Au cours de l'irradiation le rapport K_{500}/K_{600} diminue progressivement. Plus démonstrative est l'étude des variations du rapport K_{630}/K_{600} . Celles-ci sont représentées sur la courbe 1 de la figure 11. L'allure de cette courbe évoque la superposition de deux phénomènes :

- Le premier, prédominant au début de l'irradiation, est une augmentation du rapport ; elle est due à la formation de méthémoglobine car en effet K_{630}/K_{600} a une valeur plus importante pour la méthémoglobine que pour l'oxyhémoglobine. La courbe 2 représente les variations de ces rapports s'il s'agissait de méthémoglobine classique. Elle a été établie en calculant les rapports théoriques K_{630}/K_{600} d'une solution d'oxyhémoglobine + méthémoglobine "ferricyanure" dont les taux de méthémoglobine correspondent à ceux de la solution irradiée (Tableau II).

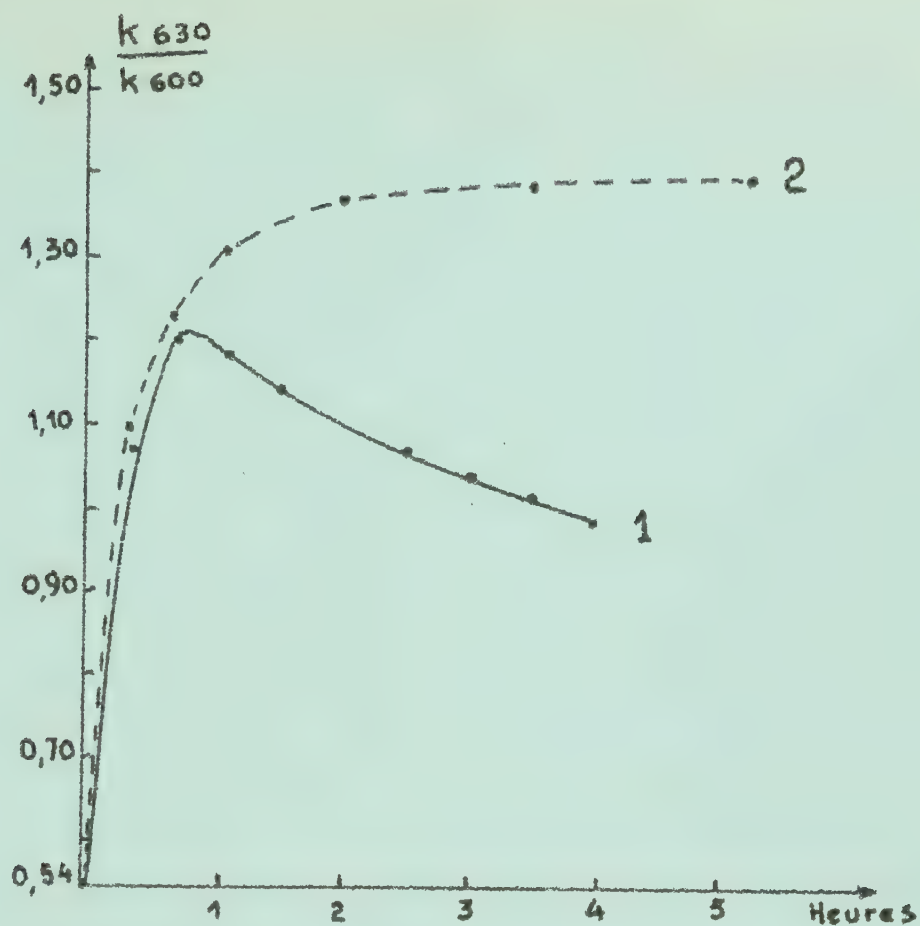


Figure 11

Variation du rapport K630/K600 en fonction de la durée d'irradiation

Solution d'oxyhémoglobine humaine

Concentration : 1,9 g p. 100 ml

pH : 5,6

Température : 2°C

1 - Courbe expérimentale

2 - Courbe théorique, dans l'hypothèse d'une simple méthémoglobi-
nisation.

TABLEAU II

Durée d'irradiation	Taux de méthémoglobine formée	Rapport théorique K 630/K 600
20 mn	35 %	1,100
40	55	1,235
65	75	1,320
90	81	1,360
120	85	1,375
210	87	1,390
240	88,5	1,395
300	91	1,400

- Le deuxième phénomène est beaucoup plus intéressant : c'est une diminution de la valeur du rapport K 630/K 600. Il est prépondérant au bout d'un certain temps d'irradiation et paraît propre à l'irradiation ultra-violette elle-même.

Pour voir s'il s'agit réellement d'un phénomène distinct de la méthémoglobinisaton, il a paru intéressant d'étudier l'effet de l'irradiation sur l'hémoglobine déjà transformée en méthémoglobine par voie chimique.

Irradiation de méthémoglobines obtenues par voie chimique.

a) Action des rayons ultra-violets sur la méthémoglobine "ferricyanure".

Conditions expérimentales : méthémoglobine "ferricyanure" humaine à 1 g p. 100 ml en tampon PC_4HNa_2 $\text{PC}_4\text{H}_2\text{K}$ M/30, température d'irradiation : 8°C, pH d'irradiation 7.

Après une heure d'irradiation, la solution passe du brun au rouge brillant et le spectre ne présente plus qu'une bande dont le maximum se situe à 540 m μ ; si on ajoute alors de l'hydrosulfite de sodium apparaît le spectre de l'hémoglobine réduite.

Plusieurs auteurs, parmi lesquels ZEYNECK, ont signalé la formation spontanée de "photométhémoglobine" qui ne serait autre

que de la cyanméthémoglobine, à partir de méthémoglobine préparée par le ferricyanure de potassium et laissée à l'air et à la lumière solaire. Il se pourrait donc que l'évolution de la méthémoglobine observée sous l'effet des rayons ultra-violetts soit due à la présence de ferricyanure de potassium dans la solution (et dont il est impossible de se débarrasser totalement) et non à l'évolution de la méthémoglobine elle-même. Ceci nous a conduit à étudier l'effet des rayons ultra-violetts sur une méthémoglobine obtenue sans adjuvant chimique risquant d'entraîner par lui-même des réactions, en choisissant la méthémoglobine auto-oxydée.

b) Irradiation de la méthémoglobine auto-oxydée.

Mise en évidence des modifications spectrales.

Conditions expérimentales : méthémoglobine humaine à 1,5 g p. 100 ml en tampon phosphate M/30, pH 7, irradiée 5 heures à la température de 0°C.

La comparaison des spectres des formes acides de la méthémoglobine auto-oxydée avant et après irradiation, illustrée par la figure 12 montre le passage du spectre typique de la méthémoglobine classique à un spectre qui présente toutes les caractéristiques de la méthémoglobine ultra-violette.

Modifications des rapports d'absorption :

	<u>Avant irradiation</u>	<u>Après irradiation</u>
K 630/K 600	1,50	1,08
K 500/K 600	3,50	2,35

Signalons que l'irradiation n'entraîne aucune modification spectrale de la forme alcaline de la méthémoglobine auto-oxydée.

La valeur des rapports K 576/K 590 déterminée à pH alcalin reste égale à 1,27 avant et après irradiation. Il s'ensuit que le

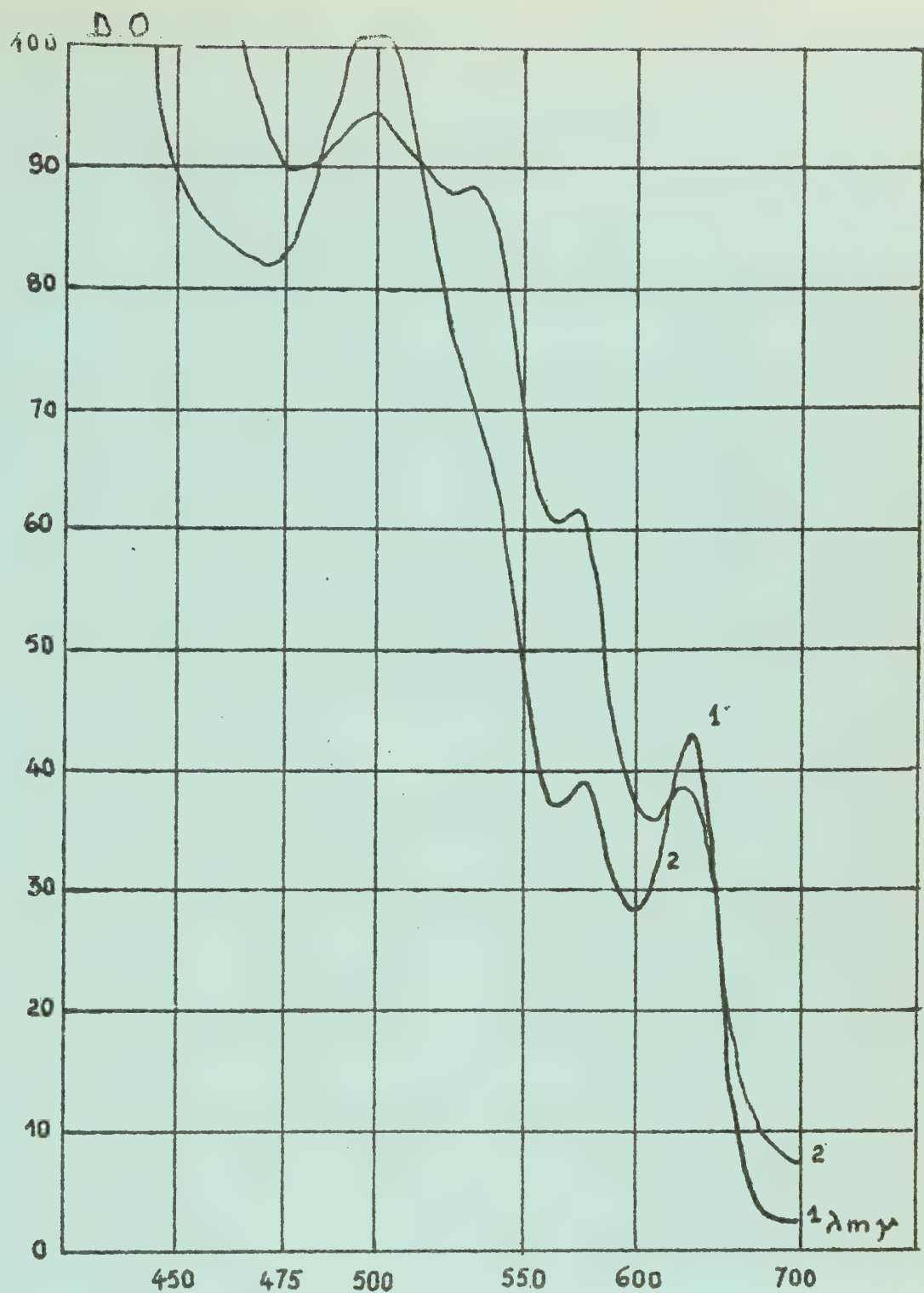


Figure 12 : Spectre d'absorption de la méthémoglobine auto-oxydée

1 - Avant irradiation

2 - Après irradiation

Méthémoglobine auto-oxydée humaine

Concentration : 1,5 g p. 100 ml

pH : 7

Température : 0°C

Durée d'irradiation : 5 heures

taux de méthémoglobine en solution n'a donc pas varié.

Cinétique :

Conditions expérimentales : méthémoglobine auto-oxydée d'agneau à 1 g p. 100 ml en tampon phosphate M/30, pH 5,28 ; température d'irradiation 17°C.

L'allure de la courbe de variation K 630/K 600 en fonction de la durée d'irradiation rappelle celle de la partie décroissante de la courbe des variations du même rapport pour l'oxyhémoglobine irradiée (fig. 14, courbe 1).

Des "anomalies" spectrales identiques apparaissent donc par irradiation à partir de méthémoglobine comme à partir d'oxyhémoglobine ; on peut en conclure qu'il s'agit bien d'un phénomène distinct de la méthémoglobininisation elle-même.

D - Influence de divers facteurs.

Nous avons essayé de déterminer l'influence du pH et de la température d'irradiation sur les "anomalies" de la méthémoglobine ultra-violette. Pour faire une étude plus précise et éliminer les variations du rapport dues à une teneur différente de la solution en méthémoglobine, nous utilisons le quotient des valeurs K 630/K 600 (valeur "théorique" que devrait avoir le rapport si la méthémoglobine était analogue à la méthémoglobine classique) / la valeur du rapport K 630/K 600 pour la méthémoglobine obtenue par irradiation.

1°) pH.

Conditions expérimentales : oxyhémoglobine d'agneau à 1 g p. 100 ml en tampon phosphate M/30 ; température d'irradiation 8°C ; pH d'irradiation 5,28 et 8,04.

On constate que les valeurs du rapport d'absorption K 630/K 600 en fonction de la durée d'irradiation sont diminuées quand

le pH d'irradiation augmente. Mais il faut tenir compte de l'influence du pH sur la cinétique de méthémoglobinisaiton (plus lente à pH alcalin qu'à pH acide). Pour pouvoir comparer l'importance des "anomalies" spectrales qui apparaissent à pH acide et à pH alcalin, on calcule les variations théoriques du rapport K 630/K 600 d'après les courbes de cinétique de méthémoglobinisaiton à ces pH (Tableau III), et on détermine les variations du quotient rapport théorique / rapport expérimental en fonction de la durée d'irradiation (fig. 13, courbes 1 et 2). On constate que les valeurs de ce quotient sont plus élevées quand l'irradiation est réalisée à pH alcalin. Ce pH accentue donc les anomalies de la méthémoglobine qui se forme.

TABLEAU III
pH d'irradiation 5,28

Durée d'irradiation	Taux de méthémoglobine	K630/K600 expériment.	K630/K600 théorique
20 mn	35 %	1,15	1,20
40	55	1,20	1,29
60	70	1,21	1,35
90	81	1,20	1,38
120	87,5	1,19	1,40
180	94	1,18	1,42
300	94,5	1,14	1,42

pH d'irradiation 8,04

30 mn	24 %	1,06	1,12
60	59	1,12	1,31
90	76	1,11	1,37
120	81	1,14	1,38
180	87,5	1,12	1,40
300	90	1,10	1,41

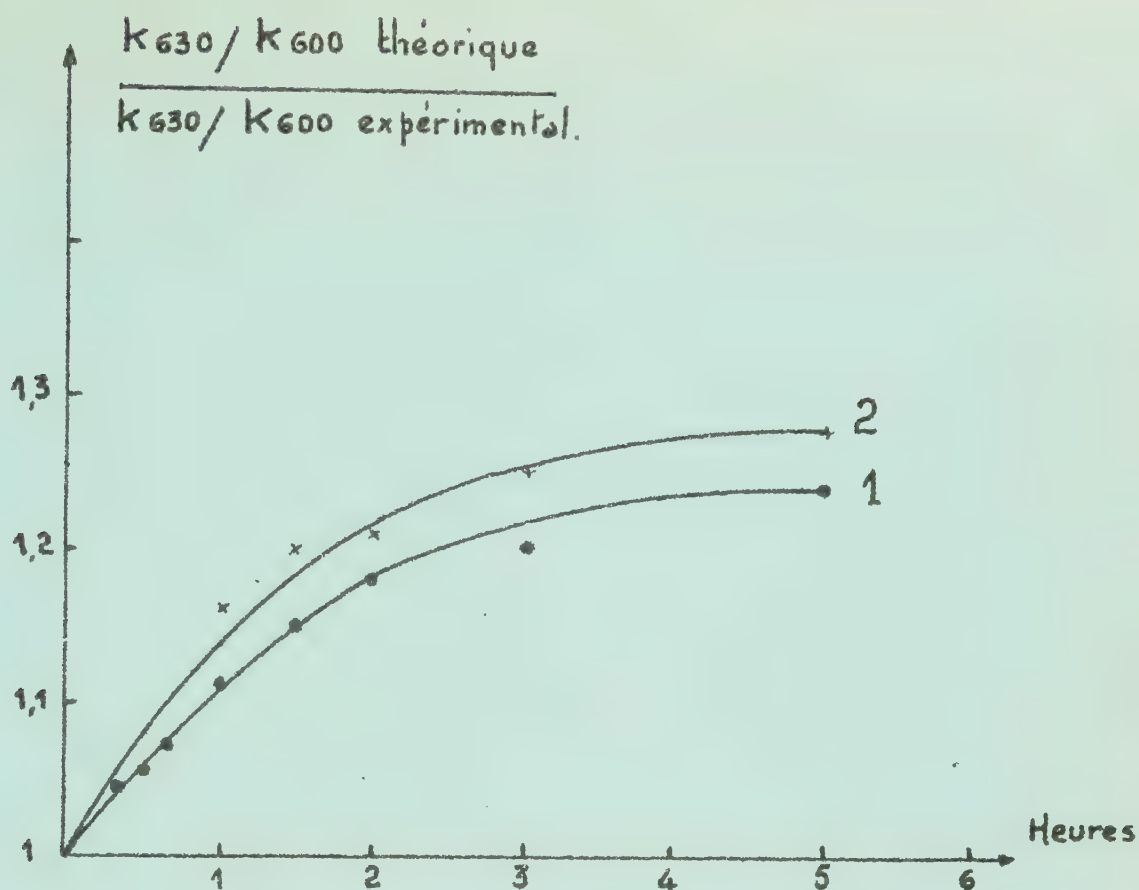


Figure 13

Effet du pH d'irradiation sur les "anomalies" spectrales

Solution d'oxyhémoglobine d'agneau

Concentration : 1 g p. 100 ml

Température d'irradiation : 8°C

1 - Irradiation à pH 5,28

2 - Irradiation à pH 8,04

Irradiation de méthémoglobine auto-oxydée : influence du pH.

Conditions expérimentales : méthémoglobine auto-oxydée d'agneau à 1 g p. 100 ml en tampon phosphate M/30, pH d'irradiation 5,28 et 8,04 ; température d'irradiation 17°C.

Les valeurs du rapport K 630/K 600 sont plus faibles quand l'irradiation est réalisée à pH 8,05 que lorsqu'on irradie à pH 5,28 (fig. 14, courbes 1 et 2) tout comme dans le cas de l'irradiation de l'oxyhémoglobine. L'apparition des "anomalies" spectrales est donc favorisée par un pH alcalin.

2°) Température.

Son rôle a été très difficile à mettre en évidence. Cependant une augmentation de température paraît accroître les anomalies spectrales.

Conditions expérimentales : oxyhémoglobine humaine à 1 g p. 100 ml irradiée à pH 5,28 en tampon phosphate M/30 ; température d'irradiation : 2° et 19°C.

On ne peut juger de l'influence de la température d'irradiation sur les anomalies spectrales par la simple comparaison des valeurs des rapports K 630/K 600 des solutions irradiées à 2°C et à 19°C, puisque la méthémoglobinisation est plus rapide à 19°C qu'à 0°C. On compare donc à ces 2 températures les courbes de variation du quotient K 630/K 600 théorique / K 630/K 600 expérimental en fonction de la durée d'irradiation (fig. 15) établies d'après les résultats suivants :

TABLEAU IV

Température d'irradiation + 2°C

Durée d'irradiation	Taux de méthémoglobine	Rapport K 630/K 600	
		Expérим.	théorique
30 mn	57 %	1,16	1,30
45	70	1,18	1,345
60	82	1,19	1,385
90	84	1,14	1,39
120	89	1,17	1,41

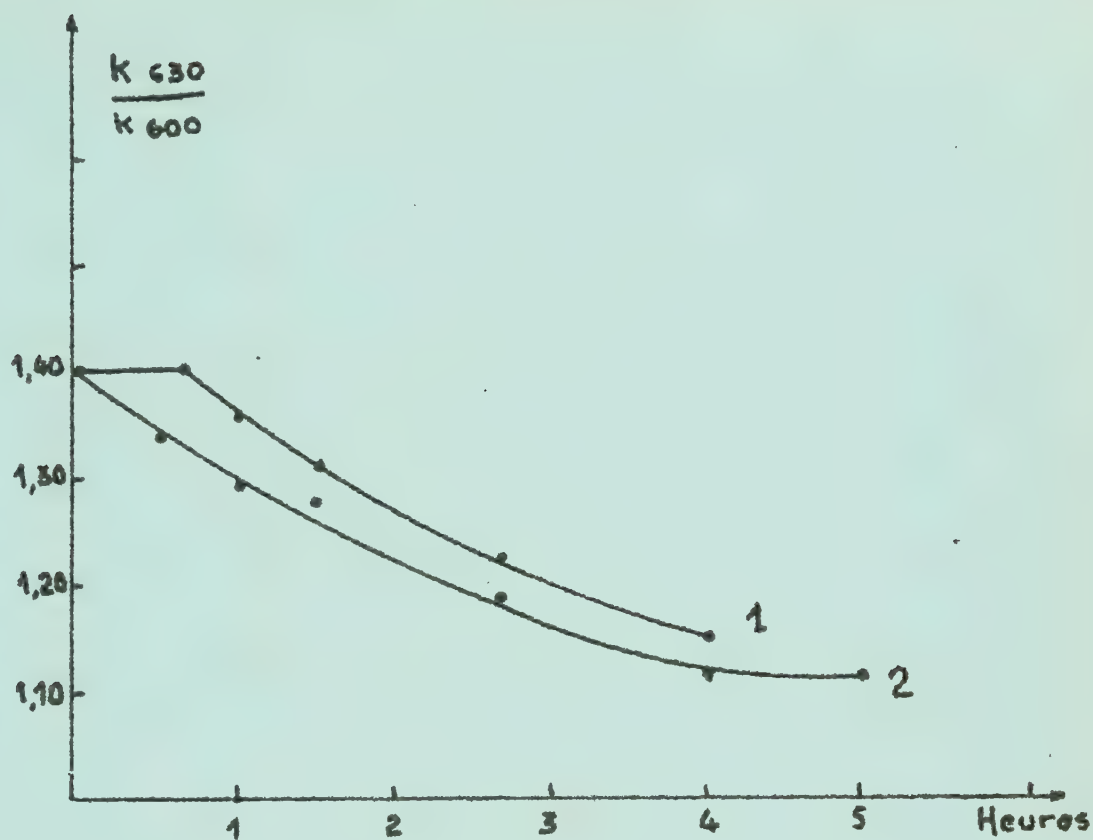


Figure 14

Effet du pH d'irradiation sur les "anomalies" spectrales

Solution de méthémoglobine auto-oxydée d'agneau

Concentration : 1 g p. 100 ml

Température : 17°C

1 - Irradiation à pH 5, 28

2 - Irradiation à pH 8, 04

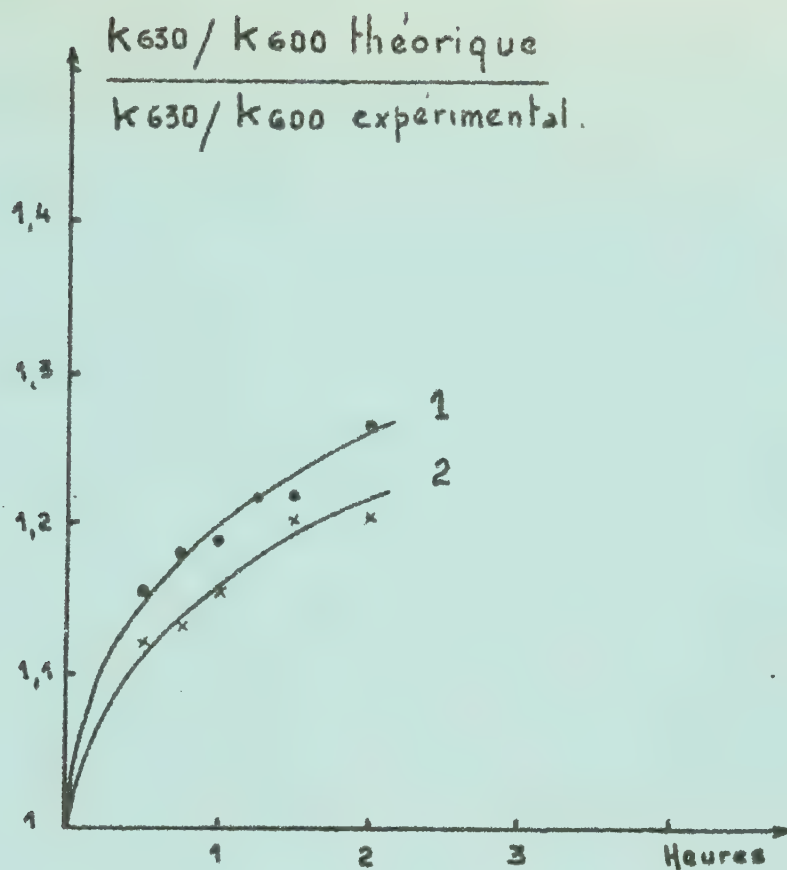


Figure 15

Effet de la température d'irradiation sur les "anomalies spectrales"

Solution d'oxyhémoglobine humaine

Concentration : 1 g p. 100 ml

pH : 5,28

1 - Irradiation à 19°C

2 - Irradiation à 2°C

Température d'irradiation + 19°C

Durée d'irradiation	Taux de méthémoglobine	Rapport K 630/K 600	
		Expérím.	théorique
30 mn	67 %	1, 19	1, 34
45	85	1, 18	1, 40
60	91	1, 18	1, 415
90	92	1, 17	1, 42
120	92	1, 12	1, 415

REMARQUE :

On sait qu'une solution d'oxyhémoglobine desséchée lentement à basse température se transforme en méthémoglobine. En lyophilisant des solutions d'oxyhémoglobine on observe qu'elles se méthémoglobinisent à 95 %. Le spectre à pH alcalin de cette méthémoglobine est pratiquement identique à celui de la méthémoglobine "ferricyanure" tandis que le spectre en milieu acide en diffère : il présente les mêmes caractéristiques que celui de la méthémoglobine ultra-violette. Les rapports d'absorption $K\ 630/K\ 600 = 1,06$ et $K\ 500/K\ 600 = 2,02$ au lieu de 1,43 et 3,2 respectivement dans le cas de la méthémoglobine "ferricyanure".

E - Formation d'un dérivé de la méthémoglobine.

Nous avons comparé les spectres d'absorption d'un dérivé de la méthémoglobine : la cyanméthémoglobine obtenue à partir de méthémoglobine "ferricyanure" et à partir de méthémoglobine ultra-violette.

Par addition de cyanure de potassium à pH 7, il y a transformation rapide des deux sortes de méthémoglobines en un composé à

bande d'absorption unique à $540 \text{ m}\mu$, mais dont l'intensité est moindre à partir de méthémoglobine ultra-violette, ce qui se traduit par une diminution du rapport d'absorption K 540/K 500.

K 540/K 500

CN méthémoglobine obtenue à partir de méthémoglobine "ferricyanure"	1,62
CN méthémoglobine obtenue à partir de méthémoglobine ultra-violette	1,35

Il semblerait donc qu'il y ait diminution de la réactivité de la méthémoglobine ultra-violette par rapport à celle de la méthémoglobine "ferricyanure" vis à vis du cyanure de potassium.

CONCLUSION.

L'irradiation d'oxyhémoglobine entraîne donc, outre la méthémoglobinisation, des modifications spectrales qui ne sont pas une conséquence directe de cette transformation. Ce phénomène a été suggéré par divers auteurs :

Selon Hugo FRICKE et PETERSEN (1927), une large part de l'action des rayons X sur une solution d'oxyhémoglobine consiste en une méthémoglobinisation, quoique d'après le spectre, ces auteurs jugeaient que ce n'était pas là la seule réaction qui avait lieu.

Selon LASER (1955), le produit initial de la réaction peut subir un changement ou une série de changements secondaires durant l'irradiation.

AFIFI (1961) observe de son côté que, si la bande d'absorption à $630 \text{ m}\mu$ caractéristique de la méthémoglobine augmente progressivement en fonction de la dose d'irradiation, il arrive un moment où elle diminue mais à un stade proche de la dénaturation où pour une irradiation très prolongée le spectre de la solution irradiée présente seulement les caractéristiques du noyau porphyrinique.

On peut souligner que les caractères spectraux que nous avons étudiés et qui distinguent le composé d'irradiation des méthémoglobines classiques sont à dissocier de la méthémoglobination elle-même mais accompagnent ce phénomène en apparaissant bien avant que le taux maximum de méthémoglobination soit atteint et dans une solution protéique limpide dont le spectre de la forme alcaline reste identique à celui des méthémoglobines classiques.

Nous avons cherché à établir s'il s'agissait d'un composé unique ou d'un mélange : par l'analyse chromatographique sur séphadex neutre G~~100~~ on constate qu'il apparaît un seul pic d'élution comme pour la méthémoglobine "ferricyanure". Nous verrons aussi que la méthémoglobine ultra-violette se comporte à l'électrophorèse comme un composé homogène.

II. - ELECTROPHORESE.

Il convenait de préciser que le composé formé par irradiation d'oxyhémoglobine était physico-chimiquement différent des méthémoglobines classiques, ce qui a pu être établi en particulier par l'étude de la mobilité électrophorétique.

Mode opératoire. La technique de l'électrophorèse sur papier a été utilisée en employant d'abord du papier Arches 301 puis des bandes d'acétate de cellulose qui ont permis une migration beaucoup plus rapide et une meilleure mise en évidence de la différence de migration entre les deux méthémoglobines.

Nous avons choisi le tampon véronal qui est le plus souvent utilisé pour les électrophorèses de solutions d'hémoglobines à des pH différents : 8,2 ; 7,6 ; 7,4 ; 6,8 ; 6,4 et à force ionique 0,075 ou



Figure 16

Electrophorèse sur acétate de cellulose

Tampon pyridine - acide acétique - eau - pH 6,5

- 1 - méthémoglobine UV

- 2 - méthémoglobine "ferricyanure".

0,050. Puis nous avons **essayé** un tampon Pyridine, acide acétique, eau, à pH 6,4 qui nous a donné des résultats beaucoup plus nets.

La tension appliquée était de 10 à 12 V/cm, ce qui correspond à une intensité de courant de 2,5 à 3 mA.

Nous avons, sur chaque bande de papier ou d'acétate de cellulose, étudié simultanément la migration de la méthémoglobine "ferricyanure" et de la méthémoglobine UV ; le volume déposé en tâches était de 1 mm³.

Résultats. L'importance de la différence de mobilité électrophorétique en tampon pyridine est vraisemblablement due à ce que la pyridine entre en réaction avec l'hémoglobine ; en effet, avec les tampons phosphate au même pH cette différence est beaucoup plus faible ; de toutes façons, en présence de pyridine à pH 6,4 les deux méthémoglobines ont un comportement électrophorétique différent (fig. 16).

Ces résultats sont peut-être en relation avec les modifications de pH subies par l'hémoglobine en cours d'irradiation.

Modification de pH des solutions d'hémoglobine sous l'effet des rayons UV.

1°) Mise en évidence.

Une solution d'oxyhémoglobine humaine à 5 g p. 100 ml est irradiée à 0°C. Le pH est mesuré avant et après des durées variables d'irradiation. Les résultats illustrés par la fig. 17 montrent qu'il y a une augmentation de pH qui passe de 7,08 à 7,26 après 3/4 d'heure d'irradiation.

2°) Une semblable augmentation de pH de l'ordre de 0,2 unités a été observée par irradiation d'oxyhémoglobine appartenant à différentes espèces animales : cheval, mouton, boeuf.

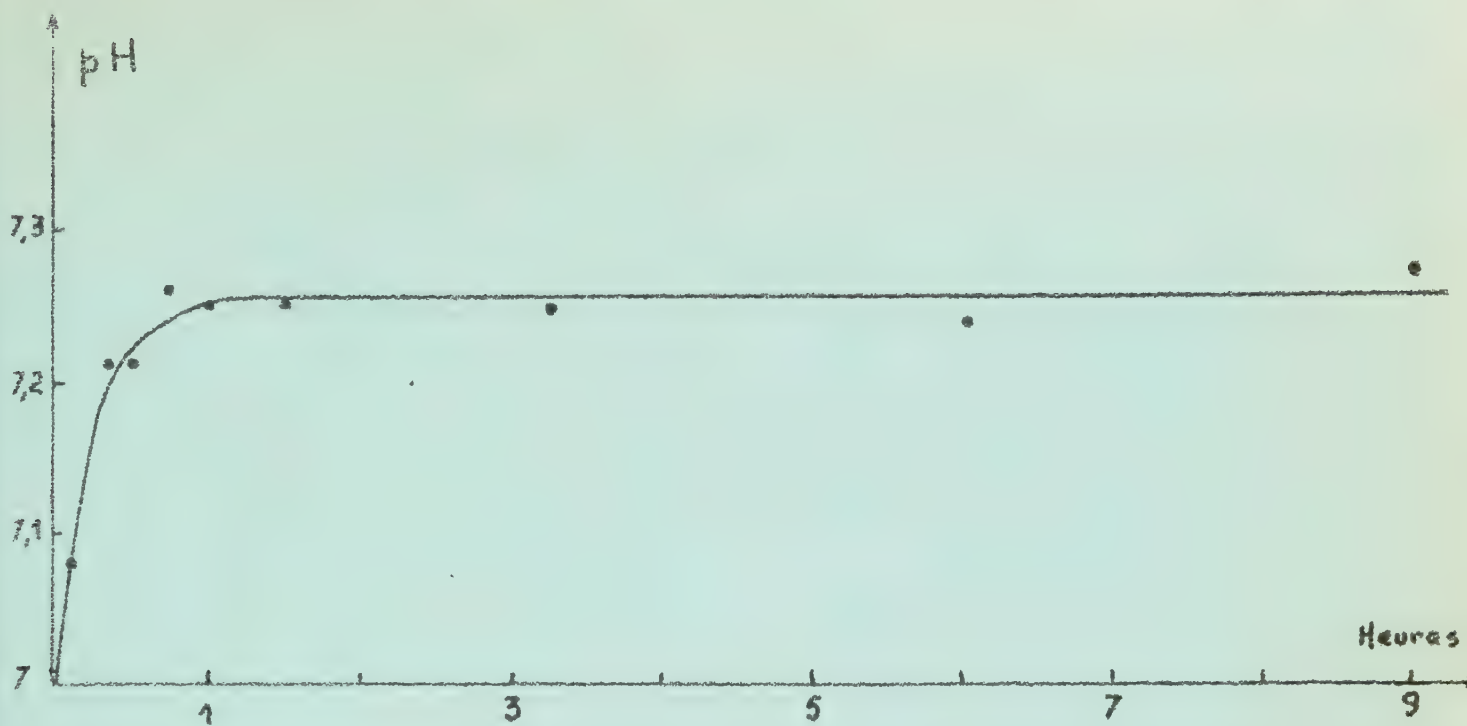


Figure 17

Variation du pH en fonction de la durée d'irradiation

Solution d'oxyhémoglobine humaine

Concentration : 5 g p. 100 ml

Température : 0°C

3°) Modification de pH de solutions d'oxyhémoglobine irradiées à différents pH.

Nous avons irradié à 22°C des solutions d'oxyhémoglobine humaine à 2 g p. 100 ml ajustées préalablement à différents pH allant de 6 à 9,5 par addition de ClH N/10 ou de NaOH N/10. Les solutions acidifiées voient leur pH augmenter en cours d'irradiation d'autant plus que le pH de départ est bas. Si, au contraire, elles ont été alcalinisées, leur pH a tendance à baisser rapidement et d'autant plus que le pH de départ est élevé. Les pH vers lesquels tendent les modifications dans ces deux cas sont voisins de la neutralité.

<u>Durée d'irradiation</u>	<u>pH</u>			
0	6,12	6,50	8	9,50
45 minutes	6,30	6,60	7,70	8,44
90 "	6,40	6,71	7,71	8,22
135 "	6,43	6,73	7,71	8,12
180 "	6,46	6,76	7,73	8,10

Une comparaison avec les modifications de pH spontanées sans irradiation que subissent les solutions d'hémoglobine acidifiées ou alcalinisées montre qu'en l'absence des rayons ultra-violet, les variations vont dans le même sens mais beaucoup plus lentement.

4°) Variations du pH de solutions d'oxyhémoglobine irradiées à différentes températures.

Des solutions d'oxyhémoglobine humaine à égale concentration de 2 g p. 100 ml et ajustées au même pH : 6,10 sont irradiées dans les mêmes conditions mais à 0°, 22° et 40°C.

<u>Durée d'irradiation</u>	<u>pH</u>		
	<u>irradiation à 0°</u>	<u>irradiation à 22°</u>	<u>irradiation 40°</u>
0	6,10	6,10	6,10
15 minutes	6,22	6,23	6,25
30 "	6,32	6,32	6,55
60 "	6,32	6,40	6,62
90 "	6,33	6,43	6,70
150 "	6,33	6,46	6,73

L'augmentation de pH est d'autant plus importante que la température d'irradiation est plus élevée. La variation du pH n'est pas due par conséquent à une réaction photochimique pure.

5°) pH de la méthémoglobine UV et de la méthémoglobine "ferricyanure".

Après dialyse contre de l'eau bidistillée de solution d'oxyhémoglobine humaine, d'oxyhémoglobine transformée en méthémoglobine par addition de ferricyanure de potassium et de solution d'oxyhémoglobine irradiée, on constate pour l'hémoglobine humaine que les pH de l'oxyhémoglobine et de la méthémoglobine "ferricyanure" sont identiques : 7,02 ; par contre celui de la méthémoglobine UV est plus élevé : 7,20.

La différence de pH entre la méthémoglobine "ferricyanure" et la méthémoglobine UV s'est vérifiée sur des échantillons d'hémoglobine appartenant à différentes espèces animales : cheval, boeuf, mouton.

Signalons que des modifications de pH de 0,1 à 0,5 unités sont rapportées par BROWN et ARGIROUDI AKOYUNOGLU (1964) en ce qui concerne des solutions de myoglobine soumises à l'irradiation γ .

III. - DENATURATION ALCALINE.

Nous avons comparé la résistance à la dénaturation alcaline de la méthémoglobine UV et de la méthémoglobine "ferricyanure".

On sait que les hémoglobines de diverses espèces animales diffèrent entre elles de façon considérable par leur résistance à la dénaturation alcaline. D'autre part, pour une même espèce animale, la méthémoglobine est beaucoup moins résistante que l'oxyhémoglobine ou la carboxyhémoglobine. Ces deux considérations nous ont amenée :

1°) à choisir comme matériel d'étude la méthémoglobine UV et la méthémoglobine "ferricyanure" de mouton ; en effet, la dénaturation des méthémoglobines humaine et de cheval est si rapide que les mesures sont beaucoup plus difficiles à effectuer avec précision.

2°) tandis que différents auteurs étudient la dénaturation de la carboxyhémoglobine ou de l'hémoglobine à des pH très voisins ou supérieurs à 12, nous avons utilisé des pH un peu plus faibles : 10,8 et 11,2 pour les méthémoglobines afin de pouvoir suivre la cinétique de la réaction.

Méthode :

On applique le principe de la méthode d'HAURCWITZ (1929) qui consiste à précipiter la protéine qui a été dénaturée par réaction pendant une durée précise avec un réactif alcalin.

- Technique :

Les résultats portés sur la fig. 18 sont obtenus en appliquant la technique suivante à une solution de méthémoglobine UV et à une solution de méthémoglobine "ferricyanure" de concentration identique : 0,83 % : 10 ml de solution de méthémoglobine sont additionnés à la température de 20°C de 1 ml de NaOH N/20 pour atteindre un pH égal à 10,8. Après des durées de contact variable on en prélève 1 ml qu'on mélange à 5 ml de solution de $\text{SC}_4(\text{NH}_4)_2$ saturée aux 2/5 et contenant la quantité de HCl nécessaire pour neutraliser la soude contenue dans 1 ml de solution de méthémoglobine ; le pH final est égal à 6,2. On laisse en contact pendant 15 heures à 4°C car la formation du précipité est lente. Après centrifugation de 15 minutes à 20 000 tours/minute on mesure la densité optique à 405 m μ du surnageant dilué au 1/10 dans un tampon phosphate M/30 à pH 7.

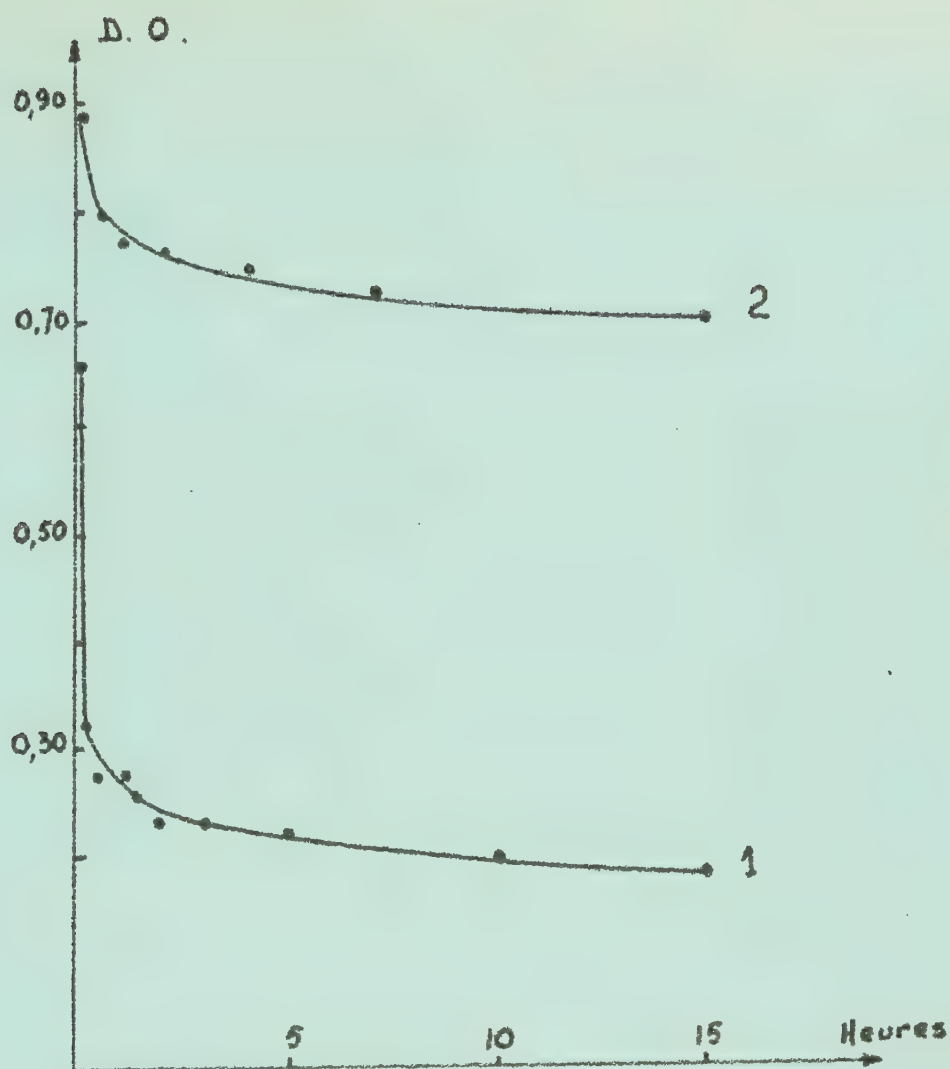


Figure 18

Dénaturation alcaline

- 1 - Méthémoglobine UV
- 2 - Méthémoglobine "ferricyanure"

Résultats :

En comparant les courbes de variation de la densité optique en fonction de la durée de contact des solutions de méthémoglobine avec la soude, on constate que la méthémoglobine UV est bien plus rapidement dénaturée que la méthémoglobine "ferricyanure".

IV. - QUELQUES INDICATIONS SUR LE COMPORTEMENT DES DESOXYHEMOGLOBINES OBTENUES A PARTIR DE METHEMOGLOBINE UV ET A PARTIR DE METHEMOGLOBINES CLASSIQUES.

On sait que la méthémoglobine obtenue par voie chimique classique peut être réduite sous forme de désoxyhémoglobine qui se transforme entièrement en oxyhémoglobine au contact de l'air. Nous avons comparé le comportement des désoxyhémoglobines obtenues après réduction de méthémoglobine "ferricyanure" et de méthémoglobine UV par l'acide ascorbique ou par l'hydrosulfite de sodium.

A - Réduction des méthémoglobines par l'acide ascorbique.

L'acide ascorbique à pH 7 et à 0°C peut réduire la méthémoglobine "ferricyanure" à un taux de 80 à 90 p. 100 en 6 heures (VESTLING, 1942). L'hémoglobine réduite s'oxygène alors au contact de l'air. Le pourcentage de l'oxyhémoglobine formée est mesuré par spectrophotométrie.

- Conditions expérimentales.

La méthémoglobine "ferricyanure" de mouton à la concentration de 2 g p. 100 ml dans un tampon phosphate M/30 à pH 7 est dialysée 4 jours contre ce tampon à la température de 4°C pour éliminer l'excès de ferricyanure.

La méthémoglobine UV de mouton est obtenue par l'irradiation d'oxyhémoglobine de mouton à 2 g p. 100 ml dans un tampon phosphate M/30 à pH 7 jusqu'à transformation en 92 p. 100 de méthémoglobine.

Ces deux solutions sont additionnées simultanément à la température de 4°C d'une solution fraîchement préparée d'acide ascorbique dans un tampon phosphate M/30, pH 7 à raison d'une molécule d'acide ascorbique par atome de fer (VESTLING, 1942). En laissant s'effectuer la réaction à basse température, on évite la formation de choléglobine par oxydation couplée de l'acide ascorbique et de l'hémoglobine (LEMBERG, 1949).

Le pourcentage d'oxyhémoglobine qui se forme est mesuré par la méthode des rapports d'absorption K 576/K 590 à pH alcalin. Les résultats montrent qu'après 6 heures de contact avec l'acide ascorbique, il y a transformation en oxyhémoglobine de 80 p. 100 de la méthémoglobine "ferricyanure" et de 25 p. 100 seulement de la méthémoglobine UV. Si on prolonge le temps de contact avec l'acide ascorbique, on ne modifie pas ces résultats.

Le taux nettement supérieur de la méthémoglobine demeuré dans la solution irradiée est-il dû à la réduction incomplète de la méthémoglobine UV par l'acide ascorbique, ou bien au fait que la désoxyhémoglobine qui provient de la réduction de la méthémoglobine UV ne peut fixer l'oxygène comme la désoxyhémoglobine obtenue à partir de méthémoglobine "ferricyanure" ?

C'est pour vérifier d'une part, les résultats donnés par l'acide ascorbique et pour répondre d'autre part à cette question, que nous avons utilisé un autre agent réducteur : l'hydrosulfite de sodium.

B - Réduction par l'hydrosulfite de sodium.

- Conditions expérimentales.

La méthémoglobine UV est obtenue à partir d'oxyhémoglobine humaine à 2 g p. 100 ml irradiée en tampon phosphate M/30 à pH 7 jusqu'à un taux de 90 p. 100 de méthémoglobine et diluée ensuite de moitié avec le tampon phosphate M/15 à pH 7.

La méthémoglobine "ferricyanure" est préparée à partir du même échantillon d'oxyhémoglobine humaine à 1 g p. 100 ml en tampon phosphate M/30, pH 7. Un égal volume de ces deux solutions de méthémoglobine est dialysé pendant 15 heures dans un même récipient contenant une solution de tampon phosphate M/30, pH 7 afin de réaliser

l'équilibre ionique dans les deux solutions de méthémoglobine.

5 ml de solution de méthémoglobine sont additionnés de 5 mg d'hydrosulfite de sodium (nous avons cherché à éviter un excès trop important d'hydrosulfite qui altère la protéine). Les spectres d'absorption sont enregistrés aussitôt après dilution, sous huile de paraffine dans une solution de tampon phosphate M/30, pH 7 où l'on a fait passer préalablement un courant d'azote pendant une heure.

- Résultats.

On observe aussi bien à partir de la méthémoglobine UV que de la méthémoglobine "ferricyanure" le spectre de l'hémoglobine réduite caractérisé par la bande de Stokes à $556 \text{ m}\mu$ et la bande de Soret à $430 \text{ m}\mu$, sans qu'apparaisse aucune trace d'hémochromogène.

L'absorption est légèrement plus forte vers $630 \text{ m}\mu$ dans le cas de la désoxyhémoglobine provenant de méthémoglobine UV ; la comparaison des spectres d'absorption des deux désoxyhémoglobines dans la région de Soret fait apparaître une diminution d'environ 10 p. 100 du coefficient d'extinction à $430 \text{ m}\mu$ de la désoxyhémoglobine provenant de méthémoglobine UV ; de sorte que le spectre de cette désoxyhémoglobine serait très comparable à celui des chaînes α et β isolées tel que le représentent ANTONINI et coll. (1965).

Les solutions de désoxyhémoglobine provenant de méthémoglobine UV et de méthémoglobine "ferricyanure" sont laissées au contact de l'air à 4°C pendant 3 heures. Par la méthode des rapports d'absorption $K 576/K 590$ à pH alcalin, on détermine le taux d'oxyhémoglobine présent :

- il est de 50 p. 100 seulement dans la solution provenant de méthémoglobine UV ;
- et de 86 p. 100 par contre, à partir de la solution de méthémoglobine "ferricyanure".

C'est un résultat identique qui est obtenu en plaçant les solutions de désoxyhémoglobine dans un tonomètre sous courant d'oxygène pendant 20, 30 et 40 minutes. En effet, à partir de méthémoglobine UV, on trouve un taux de 48 p. 100 d'oxyhémoglobine, et à partir de méthémoglobine "ferricyanure", 90 p. 100 d'oxyhémoglobine.

A noter que les résultats précédents se sont vérifiés par irradiation d'hémoglobine de différentes espèces : homme, cheval, mouton.

- Influence du pH d'irradiation.

Si la solution d'oxyhémoglobine humaine à 2 p. 100 est irradiée dans les mêmes conditions que précédemment, mais à pH plus bas : en tampon phosphate $M/30$, pH 6,3 et diluée ensuite de moitié en tampon phosphate $M/15$ pH 7 au moment de la réduction par addition d'hydrosulfite de sodium ; on constate qu'après contact à l'air pendant 3 heures ou passage d'un courant d'oxygène pendant 30 mn, le taux d'oxyhémoglobine présente dans la solution est de 58 p. 100 au lieu de 50 p. 100 quand l'irradiation est effectuée à pH 7.

La quantité d'oxygène fixé par la désoxyhémoglobine provenant de méthémoglobine UV est donc un peu plus élevée quand l'irradiation est effectuée à pH acide ; or, à ce pH qui favorise la méthémoglobinisation, on observe des "anomalies" de spectre et de la dissociation hème-globine moins importantes qu'à pH alcalin. Il semble donc bien qu'il s'agit encore d'un phénomène à dissocier de la méthémoglobinisation elle-même et qui est en relation avec les autres caractéristiques de la méthémoglobine UV, comme nous le verrons plus loin, en particulier avec la diminution du taux des groupements thiol immédiatement réactifs.

V. - ETUDE DE LA LABILITE DE LA LIAISON HEME-GLOBINE DES METHEMOGLOBINES CLASSIQUES ET DE LA METHEMOGLOBI- NE UV.

La méthode d'extraction de l'hème à partir d'hémoglobine par l'acétone ou la méthyléthylcétone peut être utilisée pour mesurer la stabilité du complexe hème-globine. Appliquée comparativement à la méthémoglobine classique et à la méthémoglobine UV, elle fait apparaître, dans le composé irradié, une modification au niveau de la liaison hème-globine.

A - Mise en évidence de la différence entre méthémoglobine UV et méthémoglobines classiques.

Nous avons comparé la méthémoglobine UV aux méthémoglobines "nitrite", auto-oxydée et "ferricyanure" ; cette dernière offre l'inconvénient d'une légère précipitation quand on abaisse le pH, ce qui est dû à la présence inévitable du ferricyanure de potassium, mais le précipité se dissout à pH très acide.

1°) Méthode.

Selon le principe de la méthode de TEALE (1959) en portant une solution de méthémoglobine à un pH assez bas (pH 2) l'hème peut être rapidement et totalement séparé de la protéine par addition de méthyléthylcétone, solvant peu miscible à l'eau ; la protéine reste dans la phase aqueuse, tandis que la phase cétonique surnageante contient tout l'hème.

2°) Technique.

2 ml de solution de méthémoglobine à 2 g p. 100 ml sont additionnés de 2 ml de HCl N/5 et 5 ml de méthyléthylcétone. Après agitation du mélange à température ambiante, les phases cétonique et aqueuse se séparent.

La phase cétonique est très colorée alors que la phase aqueuse, dans le cas des méthémoglobines classiques, est absolument incolore, tandis qu'elle reste colorée dans le cas de la méthémoglobine UV (fig. 20).

3°) Résultats.

- Spectre de la phase méthyl éthyl cétonique.

Il présente des maxima à 640, 540, 512 et 382 m μ et des minima à 585 et 665 m μ (fig. 19). Ces bandes d'absorption correspondent exactement à celles du spectre du chlorhydrate d'hématine en solution acétonique additionnée de ClH décrit par LEWIS (1954) comme au spectre de solution de chlorhydrate d'hématine que nous avons préparé par la méthode de DRABKIN (1935) dans de la méthyl-éthylcétone en présence de HCl.

Qu'il s'agisse de méthémoglobine chimique ou de méthémoglobine UV, les spectres des phases méthyléthylcétoniques sont les mêmes, la densité optique étant légèrement plus faible dans le cas de la méthémoglobine UV (fig. 19).

- Spectre de la phase aqueuse.

La fig. 20 montre que la phase aqueuse d'extraction des méthémoglobines classiques n'absorbe pratiquement pas dans le visible tandis que celle de la méthémoglobine UV présente 3 larges bandes dont les maxima sont à 500, 540 et 600 m μ . Donc, dans ce dernier cas, une fraction d'hème reste attachée à la protéine de la méthémoglobine UV tandis que la séparation hème-protéine est totale dans le cas des méthémoglobines classiques.

Le comportement de la méthémoglobine UV pourrait être comparé à celui de l'oxyhémoglobine.

Effectivement, en appliquant la même technique à une solution d'oxyhémoglobine, nous avons constaté que la dissociation

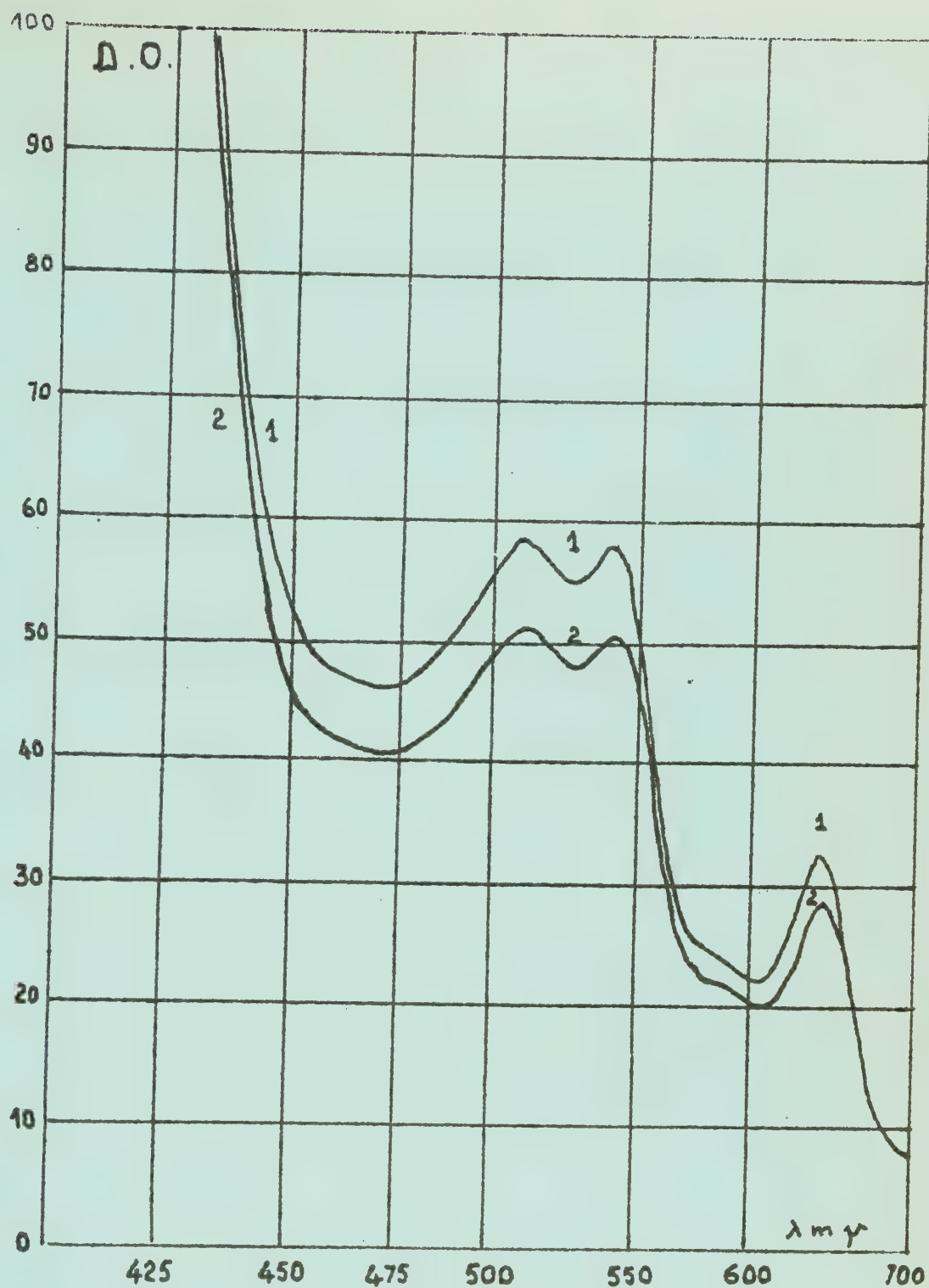


Figure 19

Courbes d'absorption de la
phase méthyléthylcétone

- 1 - Méthémoglobine "ferricyanure"
- 2 - Méthémoglobine UV

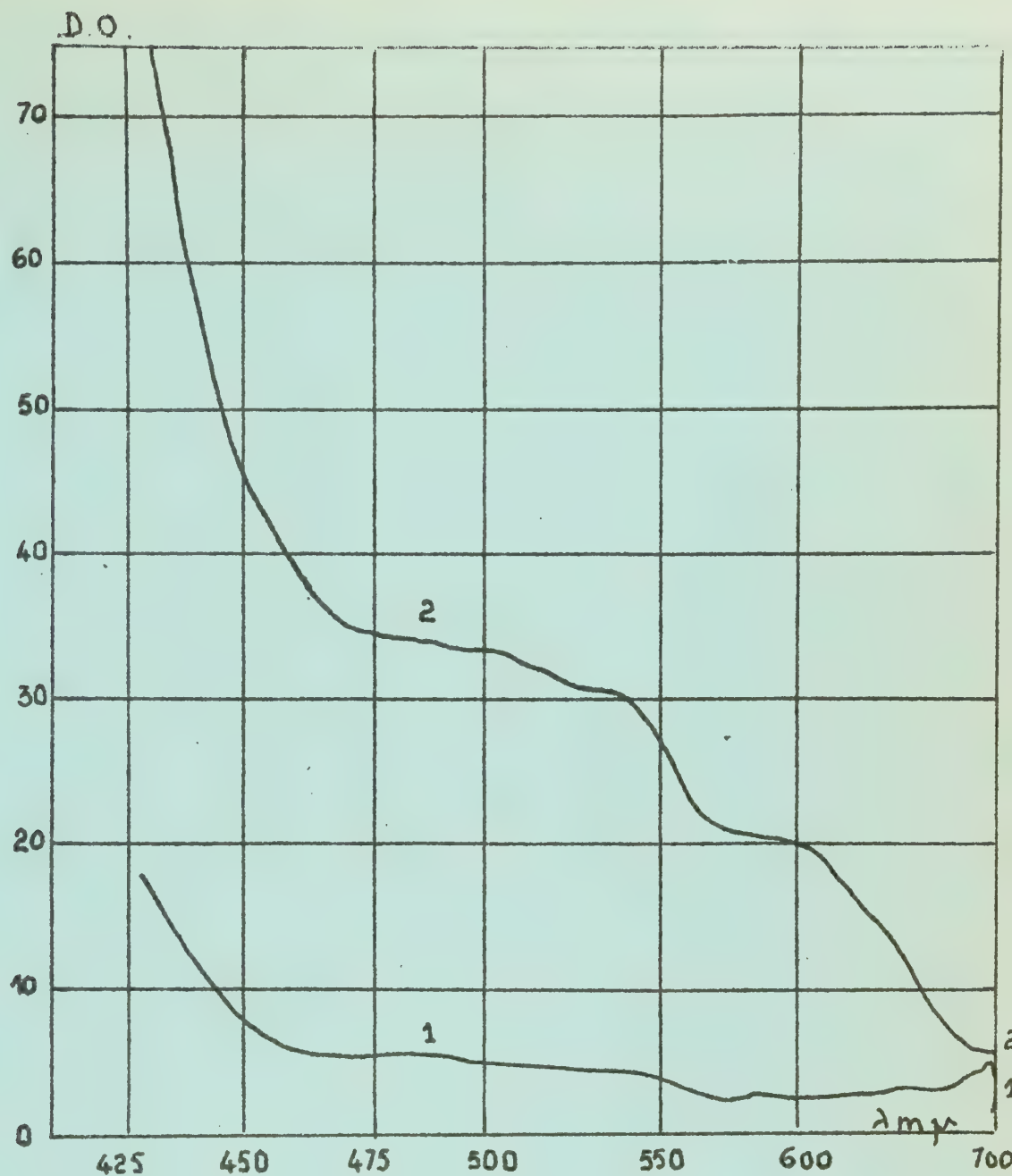


Figure 20

Courbes d'absorption de la phase aqueuse

1 - Méthémoglobine "ferricyanure"

2 - Méthémoglobine UV

hème-globine est incomplète. TEALE (1959) signale d'ailleurs que l'oxydation de l'hémoglobine par le ferricyanure de potassium est nécessaire pour obtenir une solution de globine entièrement dépourvue de chromogène, LEWIS (1954) par la méthode d'extraction de l'hème par l'acétone acide montre qu'à partir d'oxyhémoglobine les 3/4 seulement de l'hème peuvent être séparés de la fraction protéique même si le pH est abaissé jusqu'à 1.

Cependant l'oxyhémoglobine et la méthémoglobine UV se différencient aisément. En effet :

- Les phases aqueuses d'extraction de l'oxyhémoglobine et de la méthémoglobine UV restent colorées mais leurs spectres sont différents (fig. 21, courbes T et 2).

- D'autre part, selon LEMBERG et LEGGE (1949) par acidification de l'oxyhémoglobine il y aurait oxydation de la globine qui peut être prévenue par addition d'acide ascorbique. LEWIS (1954) signale que l'adjonction d'acide ascorbique préalablement à l'acidification permet alors une dissociation hème-globine totale. Compte tenu de ces observations, nous avons procédé à l'extraction de l'hème à partir d'oxyhémoglobine et de méthémoglobine UV, en ajoutant directement à 2 ml de solution protéique à 2 p. 100 1 ml d'une solution aqueuse d'acide ascorbique à 3 pour 100 avant de faire agir 1 ml de HCl N/5 et de mélanger le tout à 5 ml de méthyléthylcétone.

On constate alors que pour l'oxyhémoglobine la dissociation hème-globine est totale (il est indispensable que l'acide ascorbique soit ajouté avant l'acidification sinon la dissociation reste incomplète) tandis que même en présence d'acide ascorbique l'hème ne se sépare pas complètement de la fraction protéique de la méthémoglobine UV (fig. 21, courbe 1).

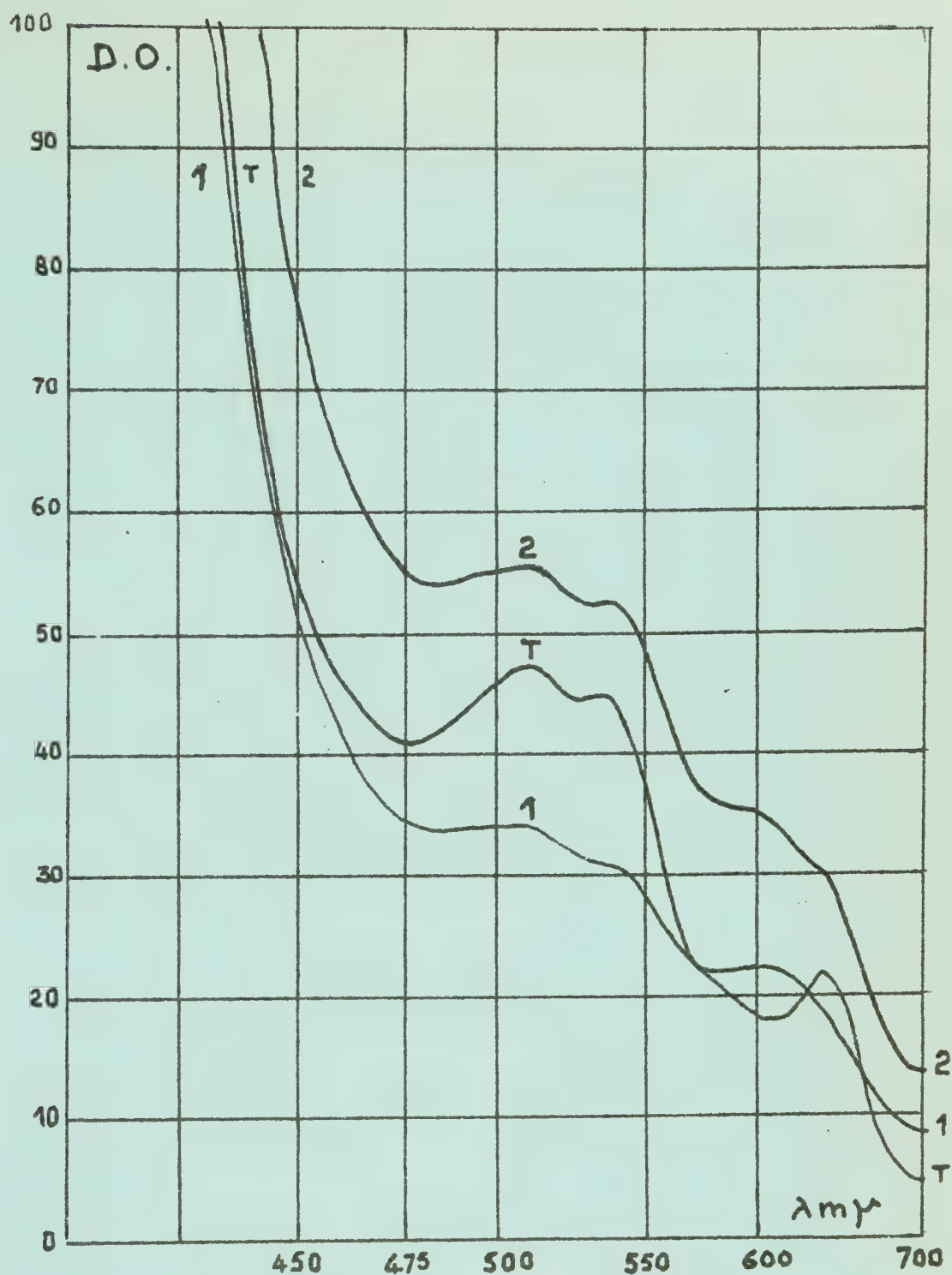


Figure 21

Courbes d'absorption des phases aqueuses

T : Oxyhémoglobine (extraction sans acide ascorbique)

1 - Méthémoglobine UV (extraction après addition d'acide ascorbique)

2 - Méthémoglobine UV (extraction sans acide ascorbique)

Donc la dissociation hème-globine est complète dans le cas des méthémoglobines classiques tandis qu'une fraction du chromogène ne peut être séparée de la protéine dans les mêmes conditions à partir de méthémoglobine UV. Nous avons montré que ce phénomène ne peut être dû à la présence d'oxyhémoglobine dans la solution irradiée, ni à un effet de l'acidification elle-même lors de l'extraction de l'hème comme dans le cas de l'oxyhémoglobine. Il semble donc être consécutif à l'irradiation ultra-violette.

B - Influence de divers facteurs.

1°) Durée d'irradiation.

Si on procède par la technique décrite et en présence d'acide ascorbique (pour éliminer l'oxyhémoglobine non encore oxydée) à l'extraction de l'hème à partir de solutions irradiées pendant des durées croissantes, on voit, illustré par les fig. 22 et 23, que la quantité d'hème demeurée dans la phase aqueuse augmente au fur et à mesure de la durée d'irradiation.

2°) Influence du pH.

Une solution d'oxyhémoglobine humaine à 2 g p. 100 ml est irradiée à température de 4°C dans un tampon phosphate M/30 pH 5,28 jusqu'à obtention d'un taux de 90 p. 100 de méthémoglobine. Une solution identique est irradiée dans les mêmes conditions jusqu'à obtention d'un taux égal de méthémoglobine, mais dans une solution de tampon phosphate M/30, pH 8. L'hème est extrait des 2 solutions par la technique précédente en présence d'acide ascorbique.

Résultat : Les spectres des phases aqueuses montrent qu'après irradiation à pH alcalin la dissociation hème-globine est moindre qu'après irradiation à pH acide.



Figure 22

Extraction par la méthyléthylcétone à pH 2 (en présence d'acide ascorbique) de l'oxyhémoglobine avant et après irradiation de 1 h, 2 h 15 et 3 h 30.

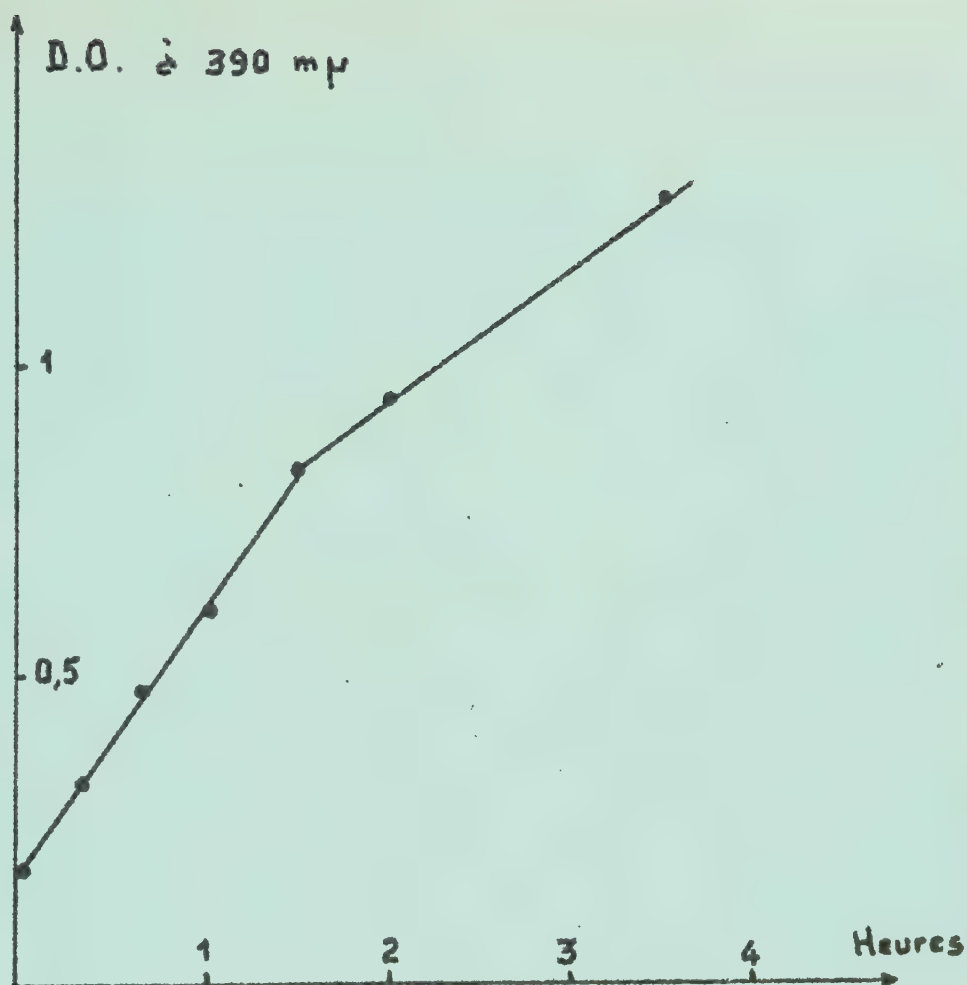


Figure 23

Variation de la densité optique à 390 mμ de la phase aqueuse d'extraction de l'hémoglobine en fonction de la durée d'irradiation.

Solution d'oxyhémoglobine de mouton

Concentration : 1 g p. 100 ml

pH : 7

Température d'irradiation = 19°C

3°) Irradiation d'hémoglobines de différentes espèces.

Nous avons obtenu des résultats identiques à partir de méthémoglobine UV humaine (adulte et foetale), méthémoglobine UV de sujets atteints du trait drépanocytaire, méthémoglobine de cheval, de mouton et de boeuf. Donc, la différence entre méthémoglobine UV et méthémoglobines classiques est indépendante des différences que présentent entre elles les fractions protéiques de ces hémoglobines.

C - Effet de l'irradiation sur les méthémoglobines classiques.

a) Nous avons irradié, dans les mêmes conditions que l'oxyhémoglobine, de la méthémoglobine auto-oxydée humaine en solution à 1 g p. 100 ml dans un tampon phosphate M/30, pH 7 ; 5, 8 et 8. Les spectres des phases aqueuses d'extraction avant et après 1, 2, 3, 4 et 5 heures d'irradiation montrent que la dissociation hème-globine de la méthémoglobine auto-oxydée est devenue incomplète après irradiation, tout comme dans le cas de l'irradiation d'oxyhémoglobine. La quantité de chromophore demeurée dans la phase aqueuse augmente en fonction de la durée d'irradiation.

b) En irradiant de la méthémoglobine "ferricyanure" dans les mêmes conditions, nous avons obtenu comme nous l'avons déjà signalé, un composé dont les caractères spectraux correspondent à ceux de la cyanméthémoglobine mais, tandis que la dissociation hème-globine est complète quand il s'agit de cyanméthémoglobine obtenue par addition de cyanure de potassium à pH 7 à de la méthémoglobine "ferricyanure", elle est incomplète dans le cas du composé obtenu par irradiation de méthémoglobine "ferricyanure".

D - Détermination du pourcentage d'hème extrait de
méthémoglobine chimique et de méthémoglobine UV
par l'acétone à différents pH.

En traitant méthémoglobine UV ou méthémoglobine chimique par l'acétone en milieu acide, la protéine est précipitée et l'hème est extrait par le solvant. Nous avons évalué les quantités d'hème qu'on peut extraire à différentes valeurs de pH, par mesure de la densité optique de la solution cétonique et en nous basant sur l'identité des spectres de l'hématine en solution cétonique acide extraite des méthémoglobines UV et chimiques. Nous avons utilisé la méthode employée par LEWIS (1954) (ou par FRONTICELLI, 1962) en l'appliquant à l'étude comparée de méthémoglobine UV (à la concentration de 1,5 g p. 100 ml irradiée pendant 4 heures à 4°C et à pH 8) et de méthémoglobine obtenue par addition de quantité équimoléculaire de nitrite de potassium à de l'oxyhémoglobine à 1,5 g p. 100 ml.

1°) Technique utilisée.

Les solutions de méthémoglobine sont additionnées de chlorure de sodium à la concentration de 8,5 g p. 100 ml afin de maintenir une force ionique élevée. 1 ml de solution est additionné de la quantité voulue de ClH 0,1 N; le volume est porté à 1,5 ml. Le pH est mesuré immédiatement après toute addition d'acide, la mesure doit être très rapide car le pH des méthémoglobines a tendance à varier vers des valeurs plus alcalines. 1 ml de la solution est transféré dans un tube à centrifugation de 50 ml et 20 ml d'acétone sont ajoutés. Après précipitation de la protéine, on centrifuge 3 minutes à 2500 tours/minute ; l'échantillon est prélevé, la densité optique est mesurée au maximum d'absorption à 540 m μ .

2°) Résultats.

- Méthémoglobine classique : Le pourcentage d'hématine extrait à chaque pH est calculé d'après la formule suivante :

$$\frac{DC_{pH} - DC_o}{DC_{oo} - DC_o} \quad 100$$

DC_o = densité optique de l'acétone surnageante après extraction à pH 7

DC_{oo} = densité optique de l'acétone surnageante après extraction obtenue à pH 2

DC_{pH} = densité optique de l'acétone surnageante après extraction à un pH donné.

Les valeurs sont portées en fonction du pH de la solution (figure 24) ; la manipulation est réalisée à la température du laboratoire. Le temps mis entre l'addition de l'acide et la lecture de la densité optique est de 6 minutes.

- Méthémoglobine UV : (fig. 24) montre que 85 p. 100 seulement de la totalité de l'hématine qui est extraite de la méthémoglobine classique sont séparés de la méthémoglobine UV.

Commentaire.

1°) La dissociation hème-globine dans le cas de la méthémoglobine UV reste incomplète même à un pH inférieur à celui où pour les différentes méthémoglobines chimiques étudiées elle est totale.

2°) Nos résultats sont peut-être à rapprocher de ceux de BRCWN et AKCYUNOGLU (1964) dans une étude des effets de l'irradiation sur les myoglobines. L'étude chromatographique sur papier de ces composés avant et après irradiation montre que pour la myoglobine non irradiée l'hème migre en totalité alors que la globine reste à l'origine, tandis que pour la myoglobine irradiée une partie de l'hème

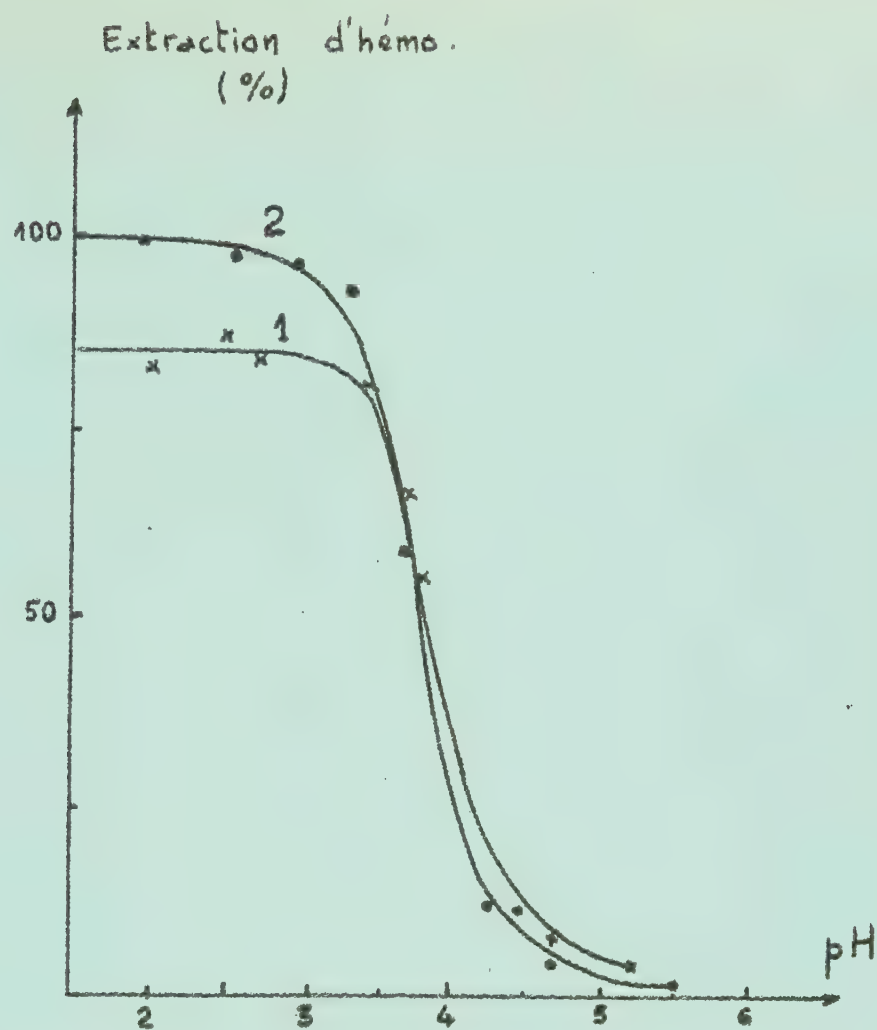


Figure 24

Pourcentage d'extraction de l'hème en fonction du pH

- 1 - A partir de méthémoglobine UV
- 2 - A partir de méthémoglobine "nitrite"

reste associée à la globine. Et à ce sujet, les auteurs posent la question de savoir si cela représente ou non une nouvelle liaison de quelque dérivé de l'hème avec la globine irradiée.

3°) Il est à signaler que pour la méthémoglobine qui se forme par dessiccation lente à froid des solutions d'oxyhémoglobine et dont nous avons déjà remarqué qu'elle présente des anomalies spectrales de sa forme acide tout à fait analogues à celle de la méthémoglobine UV, la dissociation hème-globine est incomplète comme dans le cas de la méthémoglobine UV.

CHAPITRE III

ANALYSE DE L'EFFET DES RAYONS UV SUR L'OXYHEMOGLOBINE

L'ensemble des faits décrits dans le précédent chapitre montre que, par irradiation UV d'oxyhémoglobine, on obtient un composé chimique différent des méthémoglobines classiques. Ce fait étant désormais acquis, il convenait d'essayer, par une étude séparée de l'hème et de la globine d'analyser l'effet des rayons UV au niveau de la fraction protéique, du chromophore et de leur liaison.

I. - IRRADIATION SEPARÉE DE L'HEME ET DE LA GLOBINE.

A - Irradiation de l'hème.

Etant donné l'instabilité bien connue de l'hème sous sa forme réduite, ce sont des solutions d'hématine que nous avons irradiées. Elles étaient préparées par la méthode de DRABKIN et AUSTIN (1935-6).

Un volume de solution d'hémoglobine est ajouté en agitant 1/2 heure à 6 volumes d'acide acétique glacial saturé de ClNa et maintenu à 87-90°C. Des cristaux d'hématine se forment en laissant reposer la solution à température ordinaire pendant plusieurs jours. Ils sont lavés ensuite à l'eau distillée plusieurs fois, puis laissés deux jours dans un assez faible volume d'alcool à 65 p. 100 qu'on élimine ensuite et séchés enfin à 38°C pendant 3 jours. Les cristaux sont dissous dans une solution de NaOH 0,1 N qui est diluée et portée au pH voulu.

Résultats.

On constate que le spectre de la solution d'hématine est le même avant et après irradiation, identique aussi quand l'hématine est extraite de méthémoglobine "ferricyanure" ou de méthémoglobine UV.

B - Irradiation de la globine.

La globine est extraite par la méthode de ROSSI-FANELLI et coll. (1958) à partir de solution d'oxyhémoglobine.

Un volume de solution d'oxyhémoglobine à 2 g p. 100 ml totalement dépourvue de sels est ajouté à la température de -20°C à 20 volumes d'acétone contenant 3 ml de HCl 2 N par litre. Le précipité incolore de protéine est recueilli par centrifugation à -20°C , mis en solution dans de l'eau distillée à $+2^{\circ}\text{C}$; on dialyse pendant 5 à 6 heures contre de l'eau distillée et ensuite contre une solution de CO_3HNa 0,0016 M jusqu'à ce qu'un flocculat de la fraction de globine dénaturée apparaisse, on l'élimine par filtration. La solution de globine peut être conservée une ou deux semaines à 4°C .

Conditions d'irradiation : solution de globine humaine. Concentration : 1,5 g p. 100 ml, température d'irradiation : 2°C - Durée d'irradiation 2 heures.

Résultats.

On observe des modifications évidentes du spectre de la globine (fig. 25) qui résultent d'une réaction photochimique, mais sont aussi très vraisemblablement dues à un phénomène de diffusion de la lumière.

Si on considère les variations du coefficient d'extinction entre 240 et 300 m μ où l'absorption est due essentiellement à la phénylalanine, au tryptophane et à la tyrosine contenus dans la globine,

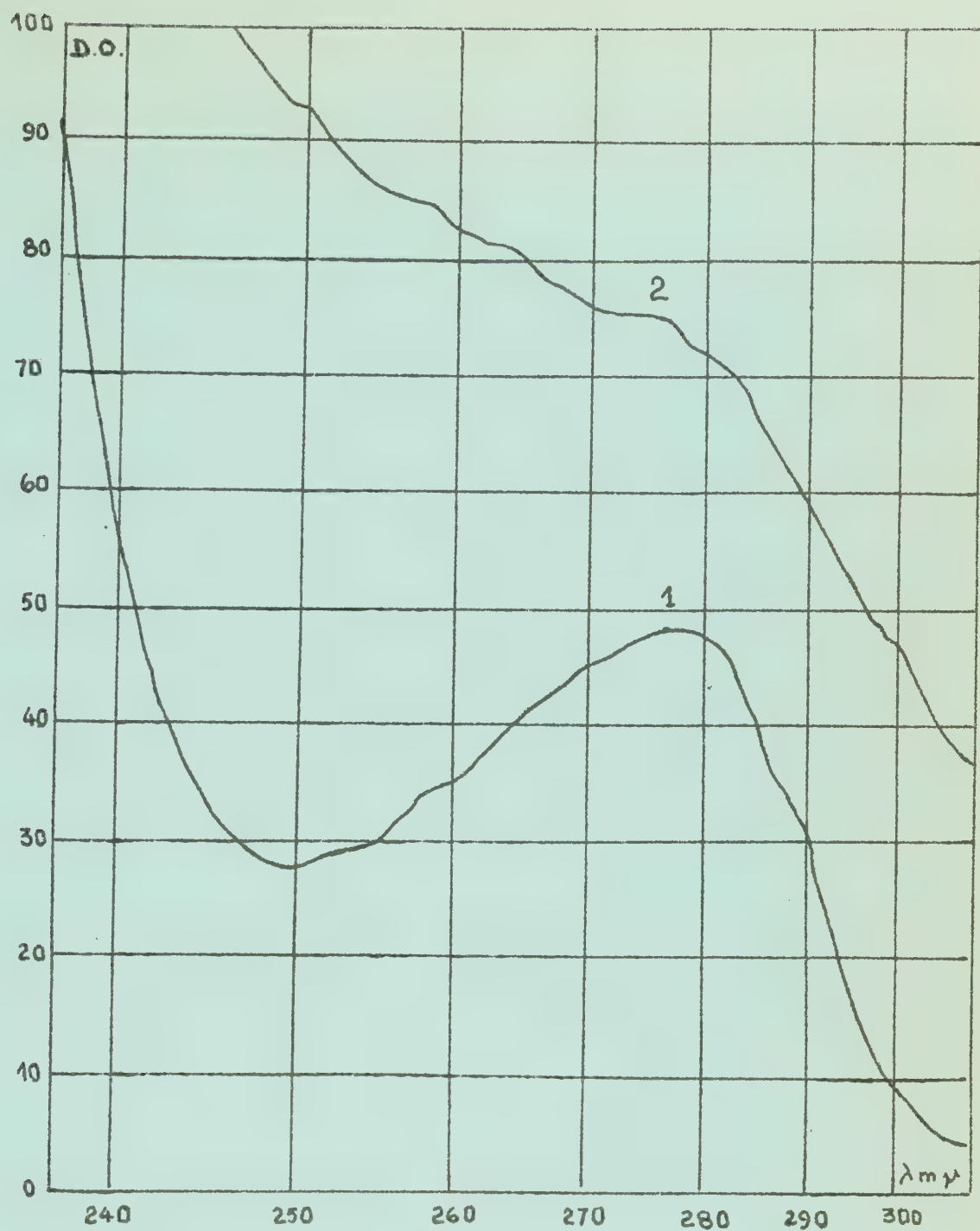


Figure 25

Spectres d'absorption de la globine

1 - Avant irradiation

2 - Après irradiation

Globine humaine

Concentration : 1,5 g p. 100 ml

Température d'irradiation : 2°C

Durée d'irradiation : 2 heures

on constate qu'il y a une augmentation sur toute la gamme de longueur d'onde, mais particulièrement dans la région où il y a, pour la protéine native, un minimum vers $250 \text{ m}\mu$.

Signalons que si on irradie non plus la globine mais l'oxy-hémoglobine, on observe des modifications spectrales tout à fait comparables dans l'UV. Cette observation est à rapprocher de celle de Duane BROWN et coll. (1964) sur l'augmentation de l'absorption entre 240 et $280 \text{ m}\mu$ des solutions de myoglobine soumises à l'effet des rayons gamma et qui serait due à l'hydroxylation des noyaux aromatiques (Mc LEAN et C. GIESE, 1959) et aussi à l'effet Tyndall.

Par conséquent, l'irradiation ultra-violette est sans effet sur le spectre de l'hématine, par contre la globine présente après irradiation des modifications spectrales évidentes. Ces résultats nous orientent vers la recherche de modifications de la méthémoglobine UV dans sa fraction protéique.

Nous avons essayé d'appliquer la technique du "Finger print" donnée par INGRAM (1958) et modifiée par BAGLIONI (1961) ; il semble qu'elle fasse apparaître des différences entre méthémoglobine UV et méthémoglobine classique mais très difficiles à déterminer.

Cependant, s'il y a modification de la fraction protéique dans la méthémoglobine UV, il semble qu'elle ne doive pas être sans rapport avec le chromophore étant donné les différences spectrales dans la région du visible ; la moindre labilité de la liaison hème-globine précise l'hypothèse de l'existence de modifications dans la région des chaînes polypeptidiques proches de l'hème. Ces considérations amènent à rechercher une atteinte éventuelle des groupements thiol dont certains (ceux qui sont immédiatement réactifs) sont adjacents à l'histidine reliée au fer de l'hème.

II. - MODIFICATION DES GROUPEMENTS THIOL DANS LA METHÉMOGLOBINE OBTENUE PAR IRRADIATION D'OXYHEMOGLOBINE.

On sait que l'hémoglobine possède des groupements thiol en nombre variable suivant l'espèce animale à laquelle elle appartient et dont certains sont susceptibles de réagir directement avec leurs réactifs habituels, tandis que les autres ne sont mis en évidence qu'après dénaturation de la protéine. Une diminution du nombre des groupements thiol réactifs dans la méthémoglobine UV est mise en évidence par dosage comparatif avec les méthémoglobines classiques et l'étude des caractéristiques de cette modification conduit à établir une corrélation avec les autres caractères distinctifs de la méthémoglobine UV que nous avons décrits.

A - Mise en évidence de la modification des groupements thiol dans la méthémoglobine UV.

1°) Technique de dosage des groupements thiol.

La technique que nous avons suivie est celle du dosage par le $\text{Cl}_2 \text{ Hg}$, méthode ampérométrique qu'utilisent ALLISON et CECIL (1958).

Appareillage : Nous utilisons un polarographe Radiometer, type PC_4 avec électrode à goutte de mercure ; caractéristique du capillaire : $t = 3,2 \text{ sec}$; hauteur de la colonne de mercure : 50 cm. L'électrode de référence est connectée par un pont de gélose saturée de ClK et tous les potentiels sont exprimés par rapport à l'électrode au calomel.

Titrages : Les titrages sont effectués à température ambiante, en tubes fermés où l'on fait passer un courant d'azote pour chasser l'oxygène des solutions. On y introduit un volume de solution d'hémoglobine correspondant à une quantité exactement connue d'environ 30 mg d'hémoglobine. Les titrages sont effectués avec une solution de $\text{Cl}_2 \text{ Hg}$ 10^{-3} M . La présence de sulfite de sodium permet de débarrasser plus rapidement les solutions de toute trace d'oxygène de sorte qu'il suffit de faire passer un courant d'azote pendant 6 à 10 mn avant le début du

titrage et après chaque addition de chlorure mercurique avant d'effectuer les mesures. L'utilisation du sulfite est permise étant donné que nous avons vérifié que méthémoglobine classique et méthémoglobine UV ne paraissent pas contenir de groupements disulfure. Les titrages sont effectués à -0,25 volts d'après les données d'ALLISON et CECIL que nous avons vérifiées par enregistrement polarographique de la courbe intensité-tension de l'ion Hg^{++} en présence d'hémoglobine montrant la vague de l'ion Hg^{++} libre.

2°) Dosage des groupements thiol réactifs.

a) Protocole expérimental :

On applique la technique précédente. La solution d'électrolyte de base est constituée de KCl 0,15 M ; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,02 M ; Na_2SO_3 0,08 M. L'effet moussant est prévenu en siliconant le tube de réaction à environ 2 cm du bord.

Selon ALLISON et CECIL, la réaction du Cl_2 Hg avec l'hémoglobine aboutit à la formation de composés du type Prot - S - Hg Cl et le point final du dosage est atteint quand le rapport Hg/SH est de 1. Le nombre d'ions Hg^{++} fixé par la molécule d'hémoglobine correspond donc au nombre de groupements thiol réactifs par molécule de protéine native.

b) Résultats :

- Hémoglobine et méthémoglobine obtenues par voie chimique.

D'après les résultats des dosages ampérométriques représentés sur la fig. 26, le taux de groupements thiol réactifs est le même : 2 par molécule, qu'il s'agisse d'hémoglobine ou de méthémoglobines obtenues par diverses voies chimiques : méthémoglobine "ferricyanure", méthémoglobine "nitrite", avec une très légère diminution pour la méthémoglobine auto-oxydée : 1,85 SH/molécule.

Rappelons qu'ALLISON et CECIL (1958) dosent 2,14 SH réactifs/molécule de carboxyhémoglobine soit un chiffre très voisin des nôtres. Qu'il s'agisse des hémoglobines et des méthémoglobines classiques humaines, de boeuf, de cheval ou de mouton, nos résultats indiquent que le taux de groupements thiol réactifs est toujours le même.

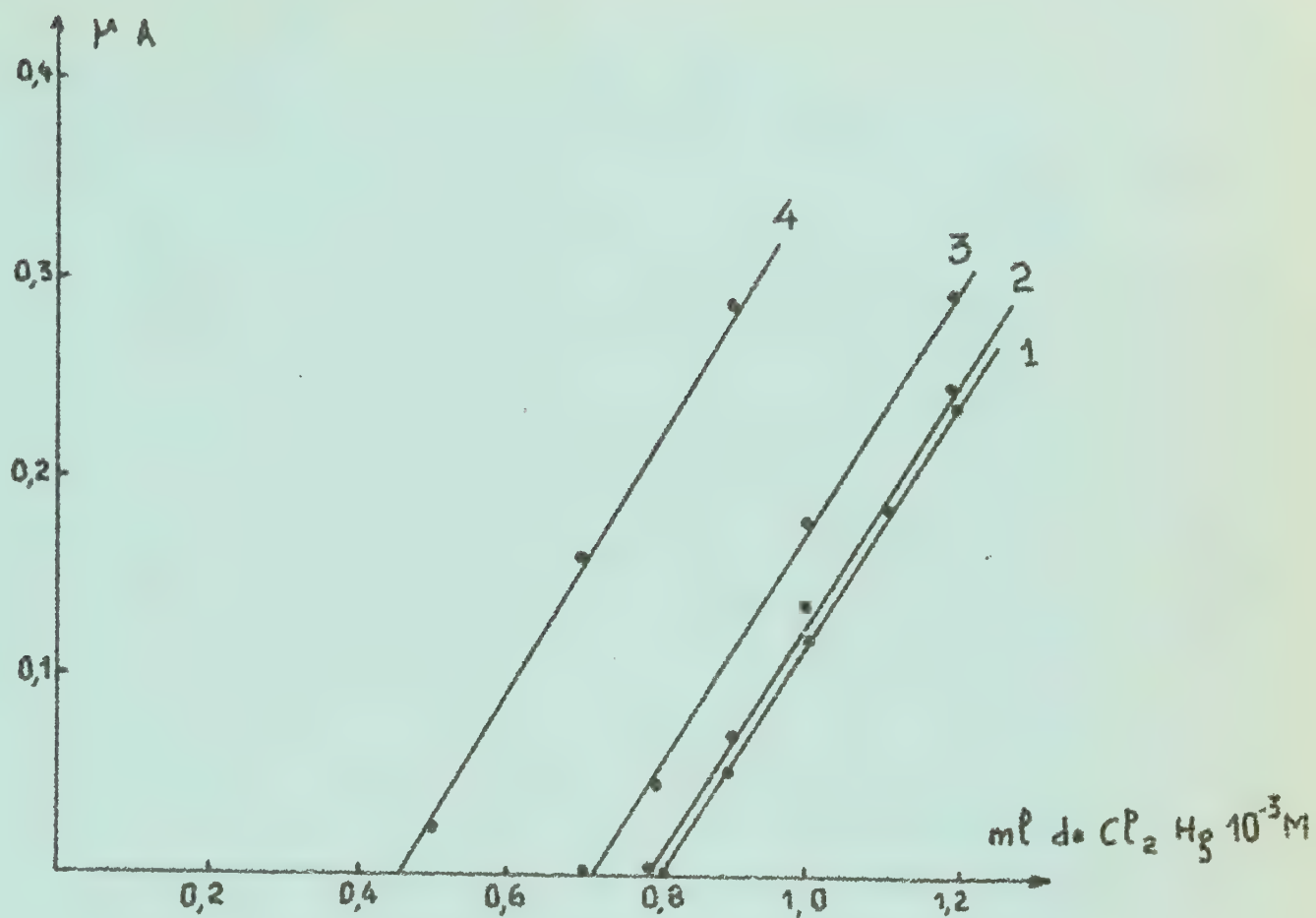


Figure 26

Courbes de titration ampérométrique des groupements thiol des différentes méthémoglobines ($U = -0,25$ volts).

- 1 - Méthémoglobine "ferricyanure"
- 2 - Méthémoglobine "nitrite"
- 3 - Méthémoglobine auto-oxydée
- 4 - Méthémoglobine UV

Nous avons observé que par vieillissement de l'hémoglobine même conservée à 4°C, le taux de groupements thiol réactifs a tendance à diminuer : après 10 jours il est de 1,8/molécule, ce qui rejoint les observations de BUCCI et coll (1965).

- Méthémoglobines UV.

Conditions d'obtention : solution d'oxyhémoglobine humaine, ou de boeuf, ou de cheval, à la concentration de 2 g p. 100 ml irradiée pendant 4 heures à pH 7, température de 2°C jusqu'à transformation en 95 p. 100 de méthémoglobine.

D'après les résultats portés sur la fig. 27, on ne retrouve plus que 1,15 groupement thiol réactif/molécule de méthémoglobine UV de boeuf ; soit 42,5 % de moins que dans les méthémoglobines classiques ; 1,13/molécule de méthémoglobine UV de cheval et 1,05/molécule de méthémoglobine UV humaine, soit des résultats très voisins entre eux.

Quelle que soit donc l'espèce animale envisagée, on ne dose plus dans les méthémoglobines UV qu'une fraction des groupements thiol réactifs de l'hémoglobine. Est-ce que les groupements thiol qui ne réagissent plus directement avec le $\text{Cl}_2 \text{ Hg}$ se comporteraient comme les groupements thiol non réactifs de la molécule d'hémoglobine qu'on ne peut doser qu'après dénaturation de cette protéine ? D'autre part, on peut aussi se demander si les groupements thiol non réactifs de l'hémoglobine ne sont pas modifiés sous l'action de l'irradiation UV, d'où l'intérêt de leur dosage. Leur taux est déterminé par différence entre le nombre de groupements thiol totaux et celui des groupements thiol immédiatement réactifs.

3°) Dosage des groupements thiol totaux.

Nous avons suivi les données d'ALLISON et CECIL selon lesquelles tous les groupements thiol réactifs et non immédiatement

réactifs de l'hémoglobine peuvent être dosés par le $\text{Cl}_2 \text{ Hg}$ après dénaturation acide.

a) Protocole expérimental :

L'hémoglobine est dénaturée par addition d'une quantité d'acide acétique suffisante pour atteindre un pH voisin de 3. Quoique les groupements thiol dans la protéine native soient stables à l'oxydation, ils ne le sont plus quand la protéine est dénaturée d'où la nécessité de précautions permettant d'éviter l'oxydation. Pour cela, l'hémoglobine est ajoutée à l'électrolyte de base (constitué de : $\text{NC}_3 \text{ K}$ 0,4 M ; $\text{Na}_2 \text{ SO}_3$ 0,08 M) dépourvu d'agent dénaturant et mise en contact avec un excès de solution de $\text{Cl}_2 \text{ Hg}$ 10^{-3} M. On fait passer un courant d'azote pendant 5 à 10 mn avant d'ajouter l'acide acétique 0,8 M. Les groupements thiol libérés par dénaturation réagissent immédiatement avec le $\text{Cl}_2 \text{ Hg}$ et leur oxydation est ainsi évitée. Selon ALLISON et CECIL, la structure de la protéine dénaturée est assez désorganisée pour que se forme le dimercaptide $(\text{R} - \text{S})_2 \text{ Hg}$, chaque atome de mercure fixant alors 2 groupements thiol.

Nous avons choisi 2 hémoglobines d'espèce différente qui ne renferment pas le même nombre de groupements thiol totaux : l'hémoglobine de cheval et l'hémoglobine humaine.

b) Résultats :

- Méthémoglobines de cheval.

Méthémoglobine "ferricyanure" : 2,075 Hg^{++} sont fixés par molécule de protéine ; le nombre total de groupements thiol est donc de 4,15 par molécule, chiffre très voisin des résultats de CULLIS et coll (1962) selon lesquels la molécule d'hémoglobine de cheval contient un total de 4 groupements thiol.

Méthémoglobine UV : Conditions d'obtention : solution d'oxyhémoglobine de cheval à 2 p. 100 en tampon phosphate M/30, pH d'irradiation 7, température d'irradiation 0°C, durée d'irradiation 4 heures.

D'après les résultats du dosage, il y a un total de 2,9 groupements thiol par molécule de protéine. Si l'on tient compte du

fait qu'il y a une diminution de 1 groupement thiol réactif par molécule, on voit que la différence entre le nombre de groupements thiol totaux des deux méthémoglobines est représentée très approximativement par la perte en groupements thiol réactifs de la méthémoglobine UV. Par conséquent, le nombre de groupements thiol non réactifs est le même pour la méthémoglobine UV et pour la méthémoglobine "ferricyanure".

Nous avons tenu à vérifier ce résultat sur une autre hémoglobine : l'hémoglobine humaine qui renferme le même nombre de groupements thiol réactifs, mais 4 groupements thiol non réactifs au lieu de 2 pour l'hémoglobine de cheval.

- Méthémoglobine humaine.

Méthémoglobine "ferricyanure" : D'après les résultats de nos dosages 3,1 Hg^{++} sont fixés par molécule ce qui représente un total de 6,2 groupements thiol par molécule (Notons qu'ALLISON et CECIL dénombrent 6 groupements thiol par molécule de carboxyhémoglobine humaine).

Méthémoglobine UV : Elle est obtenue dans les mêmes conditions que la méthémoglobine de cheval. On trouve que 2,45 Hg^{++} sont fixés par molécule. Il y a donc un total de 4,9 groupements thiol, soit 1,1 de moins que dans la méthémoglobine "ferricyanure". Or, ce chiffre correspond à la différence du taux de groupements réactifs entre les deux méthémoglobines qui est de 1,05 groupement thiol.

c) Commentaire :

Il apparaît donc qu'il n'y a pas modification des groupements thiol non réactifs dans la méthémoglobine UV. Ce résultat doit être confirmé cependant en éliminant l'hypothèse de la formation de ponts disulfure qui n'existent pas, on le sait, dans l'hémoglobine ou les méthémoglobines classiques. Nous avons repris la méthode qui a servi

à ALLISON et CECIL pour le démontrer en dosant les groupements thiol en présence et en absence de sulfite.

Nous avons utilisé, dans tous nos dosages de groupements thiol, du sulfite de sodium qui permet de réduire le temps de passage du courant d'azote nécessaire à l'élimination de l'oxygène dans la solution à titrer, mais qui est susceptible de réagir avec les groupements disulfure selon l'équation :



Il s'ensuit qu'en présence de sulfite les groupements disulfure sont dosés comme des groupements thiol. Pour éliminer cette possibilité d'erreur d'interprétation dans nos dosages et déceler la présence de groupements disulfure dans la méthémoglobine UV, nous avons contrôlé nos résultats par dosage des groupements thiol sur les mêmes solutions mais sans sulfite (dans ce cas, on fait passer un courant d'azote pendant 1/2 heure avant les titrages). Or, dans ces conditions, les résultats demeurent inchangés.

Par conséquent, les groupements thiol non réactifs ne subissent pas de modification consécutive à l'irradiation tandis qu'une fraction des groupements thiol réactifs ne réagit plus avec le chlorure mercurique ni directement, ni après dénaturation de la protéine ; le taux de ces groupements modifiés varie, nous allons le voir, avec la durée d'irradiation, la température, le pH et l'atmosphère d'irradiation.

B - Cinétique des variations du taux de groupements thiol réactifs.

Conditions expérimentales : solution d'oxyhémoglobine de cheval à la concentration de 2 g p. 100 ml en tampon phosphate 1L/30 pH 7, température d'irradiation 2°C.

La figure 27 A représente la variation du nombre de groupements thiol réactifs en fonction de la durée d'irradiation, tandis que la figure 27 B en est l'expression semi-logarithmique, $\log x = f(t)$, où x est le pourcentage de groupements thiol réactifs résiduels. On constate que cette courbe, d'allure décroissante, démarre linéairement ; la pente diminue ensuite sensiblement en valeur absolue. Nous avons schématisé la marche de la réaction, dans les différents cas, en assimilant cette courbe à deux segments de droite successifs, D_1 et D_2 , dont les pentes, j_1 et j_2 , sont les pentes moyennes dans la première et la deuxième phase de la cinétique observée ; les courbes expérimentales s'écartent en effet assez peu de ce schéma. Les droites D_1 et D_2 se coupent en un point P dont l'ordonnée correspond à un taux résiduel X des groupes thiol qui varie suivant les conditions expérimentales. Nous caractérisons la réaction, dans ce qui suit, par les valeurs de j_1 , j_2 et X ; j_1 et j_2 pourraient être considérées comme des constantes de vitesse de réaction de 1er ordre relatives à la première phase et à la deuxième phase de la cinétique - dans les limites de temps où nous l'avons étudiée -.

Nous tenons pourtant à bien préciser que ce mode d'expression ne saurait être considéré comme la seule interprétation possible des cinétiques présentées. L'hypothèse d'une réaction tendant vers un équilibre pourrait éventuellement être avancée et mise à l'épreuve par des expériences de plus longue durée.

D'après les résultats expérimentaux illustrés par les figures 27 A et 27 B, l'ordonnée du point d'intersection des droites D_1 et D_2 correspond à un taux résiduel de 64 p. 100 de groupements thiol. Les "constantes de vitesse" $j_1 = 0,6 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ et $j_2 = 0,1 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$.

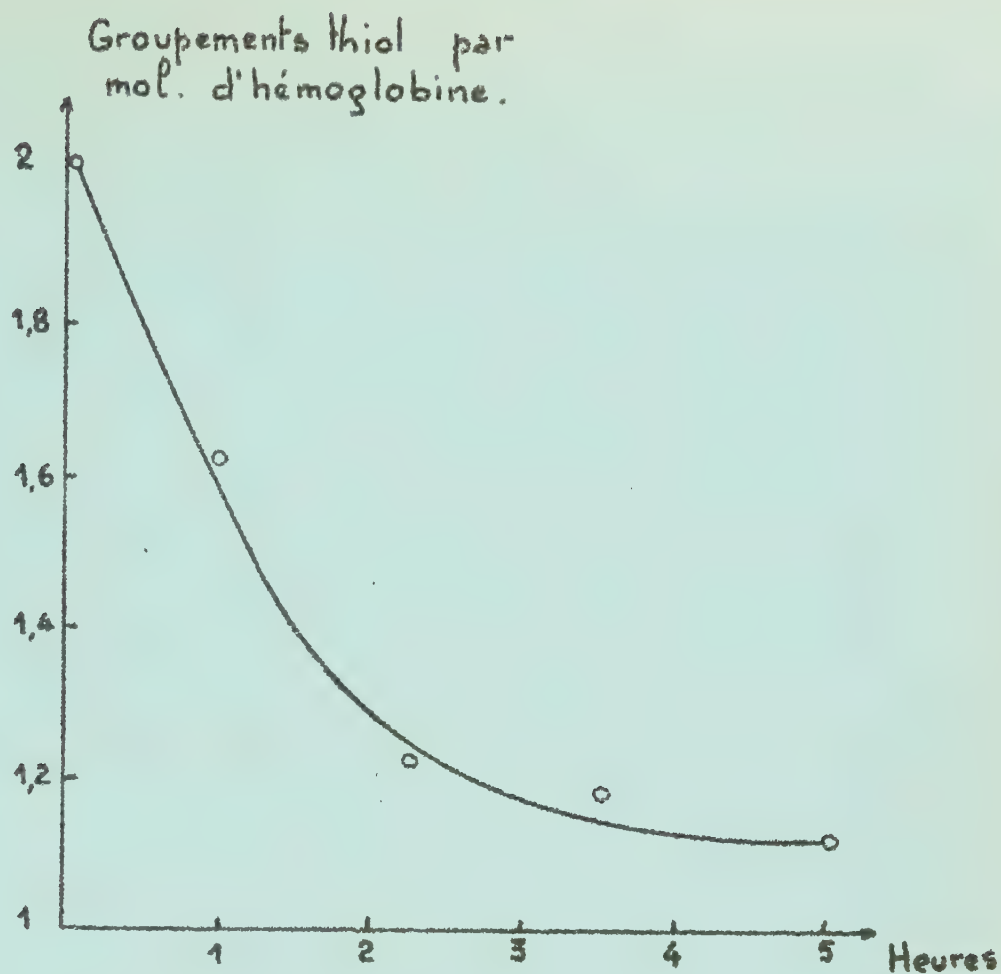


Figure 27 A

Variation du nombre de groupements thiol de l'hémoglobine en fonction de la durée d'irradiation.

Solution d'oxyhémoglobine de cheval

Concentration : 2 g p. 100 ml

pH : 7

Température : 2°C

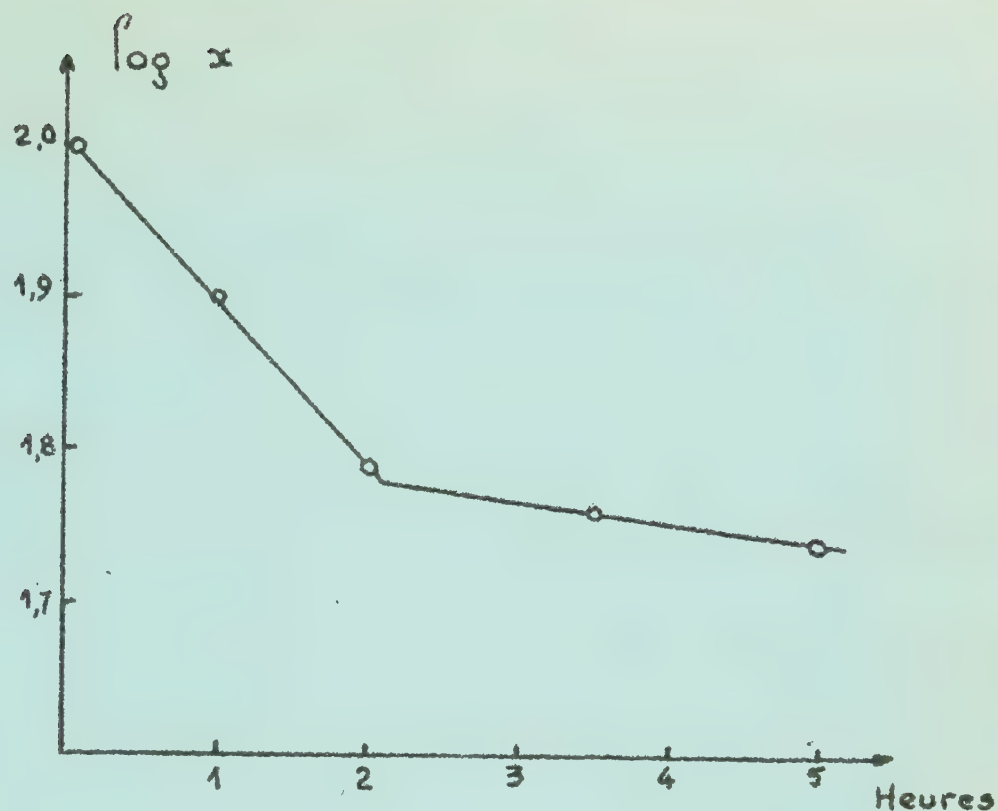


Figure 27 B

Variation de $\log x$ en fonction de la durée d'irradiation

x : pourcentage de groupements thiol restant

Solution d'oxyhémoglobine de cheval : concentration : 2 g p. 100 ml

pH : 7

température : 2°C

Influence de différents facteurs.

1°) Température.

Conditions expérimentales : oxyhémoglobine humaine concentration 2 g p. 100 ml en tampon phosphate M/30, pH d'irradiation 7, température d'irradiation 0° et 29°C.

De la comparaison des courbes de cinétique de diminution du taux de groupements thiol à 0° et 29°C (fig. 28) il ressort que l'augmentation de température favorise la diminution du taux de groupements thiol réactifs. Il ne s'agit donc pas d'une réaction photochimique pure.

Si on représente pour chaque température d'irradiation les variations de $\log x$ en fonction de la durée d'irradiation, on constate que le point d'intersection des 2 droites D_1 et D_2 correspond :

- à un taux résiduel de 72 p. 100 de groupements thiol quand l'irradiation se fait à 0°C.
- à un taux résiduel de 56 p. 100 de groupements thiol quand l'irradiation se fait à 29°C.

D'après ces données, le calcul des "constantes de vitesse" donne les résultats suivants :

	j_1	j_2
- irradiation à 0°C	$0,8 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$	$0,6 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$
- irradiation à 29°C	$1,5 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$	$0,6 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$

Il apparaît qu'en début d'irradiation la diminution du taux des groupements thiol se fait avec une vitesse un peu plus grande à 29°C qu'à 0°C, elle est plus importante donc à 29°C qu'à 0°C. Lorsqu'elle atteint 28 p. 100 de groupements thiol à 0°C et 44 p. 100 de groupements thiol à 29°C, la réaction se poursuit alors avec une vitesse plus faible et qui est la même aux deux températures. Nous avons calculé d'autre part les vitesses j de méthémoglobinisation au cours de ces 2 expérimentations :

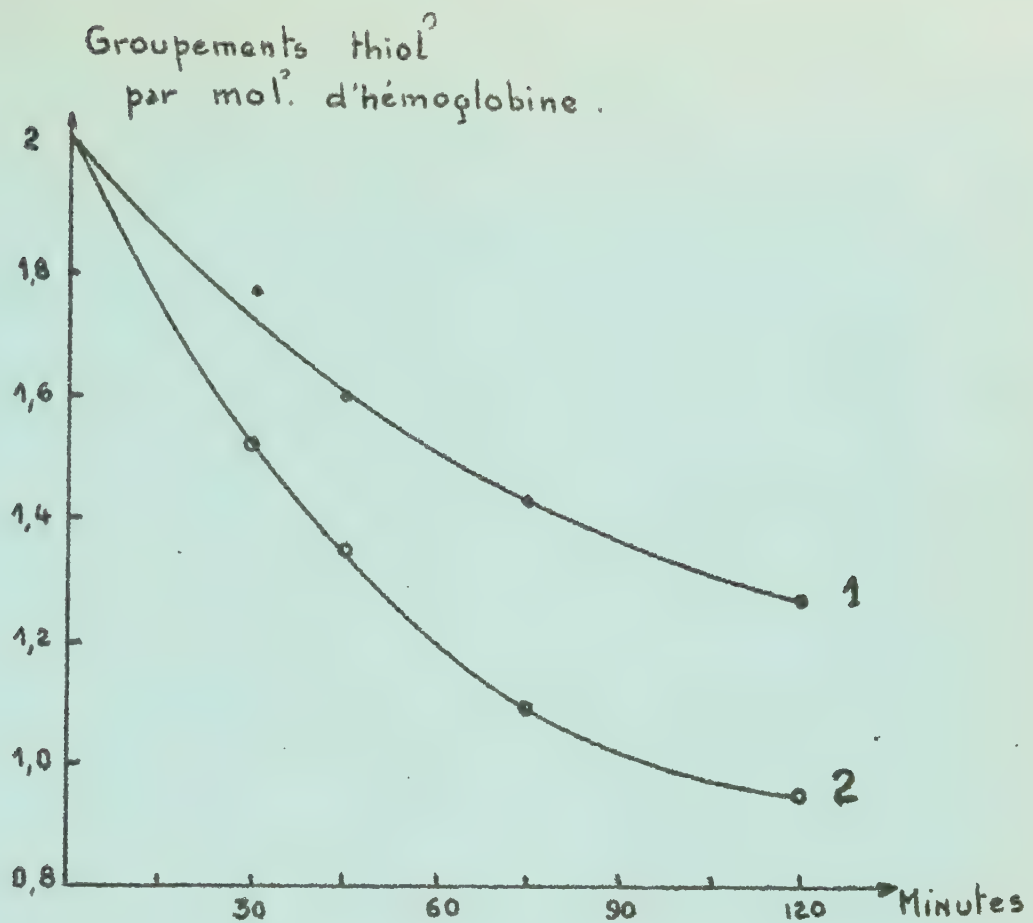


Figure 28

Influence de la température sur la variation du nombre de groupements thiol de l'hémoglobine au cours de l'irradiation.

Oxyhémoglobine humaine

Concentration : 2 g p. 100 ml

pH : 7

1 - Température : 0°C

2 - Température : 29°C

- Irradiation à 0°C : $j = 2 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$
- Irradiation à 29°C : $j = 3,2 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$

2°) pH.

Conditions expérimentales : solutions d'oxyhémoglobine humaine à la concentration de 0,82 g p. 100 ml en tampon phosphate M/30, température d'irradiation 18°C, pH d'irradiation 5,28 et 8,04.

Résultats : La perte en groupements thiol réactifs est augmentée par un pH alcalin. Le point d'intersection des deux droites représentatives de $\log x = f(t)$ correspond à un taux de groupements thiol restants de :

42 p. 100 quand l'irradiation est réalisée à pH 8,04

70 p. 100 quand l'irradiation est réalisée à pH 5,28

Valeur des "constantes de vitesse"

	<u>J_1</u>	<u>J_2</u>
Irradiation à pH 5,28	$1,2 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$	$0,1 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$
Irradiation à pH 8,04	$1,3 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$	$0,2 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$

Les "constantes de vitesse" de diminution du taux de groupements thiol à pH acide et alcalin sont donc très voisines qu'il s'agisse de la phase rapide du début ou de la 2ème partie plus lente, l'effet essentiel du pH alcalin étant de permettre à la réaction de se poursuivre plus longtemps à la vitesse J_1 .

3°) Atmosphère d'irradiation.

L'expérimentation est réalisée en utilisant le dispositif pour irradiation en atmosphère conditionnée sur l'hémoglobine humaine à 1,9 g p. 100 ml en tampon phosphate M/30, pH d'irradiation 7, température d'irradiation 4°C, volume irradié 8 ml en tube de quartz.

a) Irradiation en atmosphère d'azote :

La solution d'oxyhémoglobine est agitée avant irradiation sous courant d'azote dans un tonomètre pendant 30 mn (l'azote envoyé a barboté préalablement dans une solution de sulfite de sodium). La solution est maintenue sous courant d'azote pendant toute la durée d'irradiation et transvasée sous huile de paraffine dans le tube où s'effectue le dosage des groupements thiol.

Résultats : après irradiation même prolongée (plus de 5 heures), le taux de groupements thiol réactifs ne varie pas.

b) Irradiation en présence d'air et en présence d'oxygène :

On utilise le même dispositif rigoureusement dans les mêmes conditions en remplaçant seulement le courant d'azote par de l'air ou de l'oxygène. L'atmosphère d'oxygène favorise la perte en groupements réactifs de l'hémoglobine.

Exemple : après 2 heures et demi d'irradiation, le taux de groupements thiol réactifs restant est de 1,45 par molécule d'hémoglobine quand l'irradiation se fait en présence d'air, et de 1,20 seulement quand l'irradiation est réalisée en atmosphère d'oxygène.

C - Méthémoglobinisation et diminution du taux de groupements thiol réactifs.

Ces 2 phénomènes ne peuvent être considérés comme étant liés quoique soumis tous les deux à l'influence de la température (ce qui indique simplement qu'il ne s'agit pas de réaction photochimique pure) et bien qu'ils soient favorisés par une atmosphère d'oxygène.

Certains arguments permettent de les dissocier,

1°) Influence du pH.

L'irradiation à pH acide favorise la méthémoglobininisation ; au contraire, la diminution du taux de groupements thiol réactifs est plus importante à pH alcalin qu'à pH acide.

2°) Baisse du taux de groupements thiol réactifs.

Elle se poursuit sous l'effet des rayons ultra-violetes alors même que la transformation en méthémoglobine est pratiquement achevée, ce qui est particulièrement évident quand l'irradiation est réalisée à pH acide.

Conditions expérimentales : hémoglobine humaine, concentration 1,9 g p. 100 ml en tampon phosphate M/30, pH 5,6 température d'irradiation 0°C.

<u>Durée d'irradiation</u>	<u>Taux de méthémoglobine formée</u>	<u>Diminution du taux des groupements -SH</u>
120 mn	85 p. 100	25 p. 100
195 mn	87 p. 100	33 p. 100
315 mn	90 p. 100	46 p. 100

3°) Irradiation de méthémoglobine auto-oxydée.

Méthémoglobininisation et diminution des groupements thiol réactifs sont bien deux réactions distinctes puisqu'à partir de méthémoglobine auto-oxydée comme à partir d'oxyhémoglobine, on observe une modification semblable des groupements thiol réactifs par irradiation.

- Mise en évidence de la diminution du taux de groupements thiol :

Conditions expérimentales : solution de méthémoglobine auto-oxydée humaine, concentration 1 g p. 100 ml en tampon phosphate M/30, pH 5,28 température d'irradiation 27°C $\pm$ 2°C.

Résultats :

Taux de groupements thiol réactifs

- Avant irradiation 1,85 / molécule d'Hb
- Après irradiation 0,9 / molécule d'Hb

- Influence du pH d'irradiation :

Tout comme pour l'irradiation d'oxyhémoglobine, un pH alcalin augmente la perte en groupements thiol libres.

Conditions d'irradiation : elles sont les mêmes que précédemment, les pH d'irradiation sont de 5,28 et 8,05.

La courbe représentative des variations de $\log x$ en fonction de la durée d'irradiation peut être assimilée à 2 droites décroissantes D_1 et D_2 dont le point d'intersection correspond à :

- un taux résiduel de groupements thiol de 70 p. 100 quand le pH d'irradiation est 5,28.

- et de 40 p. 100 à pH 8,04.

Les valeurs des "constantes de vitesse" j_1 et j_2 sont les suivantes :

	j_1	j_2
Irradiation à pH 5,28	$1,1 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$	$0,1 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$
Irradiation à pH 8,04	$1,2 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$	$0,1 \cdot 10^{-4} \text{sec}^{-1}$

Caractéristiques spectrales, labilité de la liaison hème-globine, et modification des groupements thiol réactifs.

Il semble qu'à la modification des groupements thiol réactifs se rattachent les caractéristiques spectrales de la méthémoglobine UV et la labilité modifiée de la liaison hème-globine.

1°) Ces caractères apparaissent en cours d'irradiation mais se dissocient tous trois du phénomène de méthémoglobinisation ; l'irradiation au-delà du maximum de transformation en méthémoglobine augmente à la fois les anomalies spectrales, la quantité d'hème non dissociable de la fraction protéique et la perte en groupements thiol réactifs.

2°) Ces 3 modifications caractéristiques de la méthémoglobine UV sont influencées dans le même sens par le pH d'irradiation : un pH alcalin les favorise, un pH acide les diminue.

3°) Lorsqu'on irradie de la méthémoglobine auto-oxydée, on passe d'un composé qui a les caractères de la méthémoglobine classique à une méthémoglobine qui présente à la fois les 3 sortes d'anomalies de la méthémoglobine UV.

4°) Enfin, si on bloque les groupements thiol réactifs avant irradiation, est-ce que se forme alors sous l'action des rayons UV une méthémoglobine semblable à la méthémoglobine classique ?

- Irradiation en présence d'Iodoacétamide :

L'iodoacétamide réagit aisément avec les groupements thiol réactifs de l'oxyhémoglobine à pH neutre. Selon les observations de TAYLOR et coll (1966), il y a abolition complète des 2 groupements thiol réactifs de l'hémoglobine après contact d'une heure à 20°C et à pH 7 en utilisant l'eau pour solvant, à raison de 20 molécules d'iodoacétamide par molécule d'hémoglobine.

Conditions expérimentales : Hémoglobine de mouton, concentration 1,6 g p. 100 ml, pH d'irradiation 7 ; température d'irradiation 0°C ; concentration en iodoacétamide 20 mol/mol d'Hb.

Résultats : - Avant irradiation :

- l'hémoglobine modifiée par l'iodoacétamide ne présente aucune modification spectrale ;

- le chromophore peut être dissocié en totalité de la globine, ce qui n'est réalisable à partir d'oxyhémoglobine qu'en présence d'acide ascorbique. A noter donc que l'iodoacétamide joue le même rôle que l'acide ascorbique.

- Après irradiation :

En comparant 2 échantillons d'hémoglobine irradiés dans les mêmes conditions mais en présence et en absence d'iodoacétamide, on constate que l'anomalie spectrale est nettement moins importante en présence d'iodoacétamide, ce qui se traduit par un quotient K_{630}/K_{600} plus élevé :

	<u>K_{630}/K_{600}</u>
En présence d'iodoacétamide	1,38
En absence d'iodoacétamide	1,11

A noter que nous avons vérifié que la présence d'iodoacétamide ne modifie pas la cinétique de méthémoglobinisation. Il semble, d'autre part, que le blocage des groupements thiol augmente le taux de chromophore dissociable dans la solution irradiée.

- Irradiation en présence de Cl_2Hg :

Nous avons essayé un autre agent bloquant les groupements thiol : le Cl_2Hg mais sans résultat ; en effet, nous avons constaté qu'il ne bloque les groupements thiol que tant que la solution d'hémoglobine n'est pas en contact avec l'oxygène.

5°) Enfin, nous avons déjà fait allusion à la méthémoglobine obtenue par dessiccation lente d'oxyhémoglobine dans le vide, dont nous avons remarqué qu'elle présentait des anomalies spectrales analogues à celles de la méthémoglobine UV et que la labilité de la liaison hème-globine était modifiée dans le même sens. Restait à savoir

s'il y avait aussi diminution du taux des groupements thiol réactifs. D'après les résultats de nos dosages, il n'y a que 0,5 groupements thiol réactifs par molécule (au lieu de 2,1 dans le cas des méthémoglobines classiques).

C'est donc là un autre exemple d'une méthémoglobine qui présente, elle aussi, ces 3 types d'anomalies à la fois.

6°) MIRSKY et ANSON (1935-36), puis RIGGS et WCLBACH (1956) signalent que dans la méthémoglobine "ferricyanure" à pH 9,5 4 groupements thiol sont oxydés par le ferricyanure pour former 2 ponts disulfure. Cette oxydation doit concerner les groupements thiol non réactifs car les groupements thiol immédiatement réactifs ne sont pas modifiés. Or, nous avons vérifié expérimentalement que cette méthémoglobine là ne présentait aucune des anomalies de la méthémoglobine UV. Il semblerait donc, en résumé, qu'on puisse distinguer :

- la méthémoglobine "ferricyanure" à pH 7 qui est le type même de la méthémoglobine classique sans modification d'aucun groupement thiol de l'hémoglobine et qui nous a servi de référence ;
- la méthémoglobine "ferricyanure" à pH 9,5 dont les groupements thiol non réactifs seraient oxydés sans qu'il y ait modification des groupements thiol réactifs et qui ne présente ni anomalie de spectre, ni anomalie de la labilité de la liaison hème-globine ;
- la méthémoglobine UV dont les groupements thiol non réactifs ne sont pas atteints, mais dont le taux de groupements thiol réactifs est diminué et qui présente les 2 autres anomalies. La méthémoglobine préparée par lyophilisation présente aussi à la fois une diminution du taux de groupements thiol, les anomalies spectrales de la méthémoglobine UV et les mêmes caractères de labilité de la liaison hème-globine. Ces 3 phénomènes caractéristiques sont concomitants, il semble donc qu'il y ait corrélation entre eux.

En résumé, les modifications des groupements thiol de la méthémoglobine UV consistent en une diminution du taux des groupements thiol réactifs, observation qu'on peut rapprocher de celle de DUANE BROWN et coll. (1964) sur la myoglobine de thon (qui contient un résidu cystéine/molécule) soumise à l'irradiation γ , et celle de KAJITA et coll. (1961) sur l'effet des rayons X sur l'hémoglobine.

Quant aux groupements thiol non réactifs, puisque sous l'effet des rayons UV ils paraissent ne pas subir de modification et qu'ils sont situés à l'intérieur des chaînes polypeptidiques, il semble probable qu'il n'y ait pas ouverture de la molécule d'hémoglobine avec une élongation semblable à ce qui se produit dans le cas de la sérum-albumine irradiée, ce qui confirme l'absence de variation de viscosité.

CHAPITRE IV

DISCUSSION D'ENSEMBLE

L'étude des effets de l'irradiation UV sur l'oxyhémoglobine nous a conduit à mettre en évidence la formation d'une méthémoglobine différente des méthémoglobines obtenues par oxydation chimique douce de l'hémoglobine.

Les caractères différentiels du composé d'irradiation de l'oxyhémoglobine sous sa forme oxydée en méthémoglobine UV et sous sa forme réduite en désoxyhémoglobine, suggèrent un rapprochement avec certaines hémoglobines modifiées, en particulier les hémoglobines M ; des données bibliographiques assez abondantes et précises nous ont permis de relever plusieurs caractères analogiques entre hémoglobines M et hémoglobines irradiées, sans qu'on puisse exclure pour autant quelques rapprochements sur des données plus fragmentaires avec d'autres hémoglobines modifiées.

I. - HEMOGLOBINE M.

Mise à part la cyanose qu'elles entraînent et qui montre leur inaptitude à l'oxygénation, les hémoglobines M ont des caractères essentiels qui permettent de les distinguer des hémoglobines normales et des autres hémoglobines anormales : la mobilité électrophorétique, le spectre d'absorption dans le visible de la forme acide de leur méthémoglobine, et la substitution d'un acide aminé qui se situe toujours dans les séquences des chaînes polypeptidiques proches de l'hème.

On sait que les chaînes α et β de l'hémoglobine normale présentent 2 centres basiques : le centre basique I qui intervient dans les réactions d'oxygénation et de désoxygénation comprend dans la chaîne α l'histidine en position 58 remplacée par une tyrosine dans l'hémoglobine M_{Boston} (GERALD et EFRON, 1961) (GERALD et GEORGE, 1959), et dans la chaîne β l'histidine en position 63 qui est remplacée par une tyrosine dans l'hémoglobine $M_{\text{Saskatoon}}$ (GERALD et EFRON, 1961) (GERALD et GEORGE, 1959). Ces acides aminés substitués en 58 α et 63 β sont les histidines distales directement opposées à la 6ème coordination du fer.

Dans l'hémoglobine $M_{\text{Milwaukee}}$ (GERALD et EFRON, 1961), c'est un acide glutamique qui se substitue à une valine en position β 67, c'est-à-dire 4 résidus d'acides aminés après la position de l'histidine distale, ce qui correspond à un tour d'hélice α .

Le centre basique II qui est impliqué dans la liaison hème-globine comprend dans la chaîne α l'histidine proximale en position 87 directement liée au fer de l'hème et qui est remplacée par une tyrosine dans l'hémoglobine M_{Iwate} et l'hémoglobine M_{Kankakee} (KONIGSBERG et coll. 1965) (HELLER et coll. 1962).

Les anomalies du spectre d'absorption et du comportement électrophorétique des méthémoglobines d'hémoglobine M ont été interprétées en 1961 par GERALD et EFRON par l'existence d'un "complexe interne" entre le fer ferrique et les chaînes latérales anormales appartenant aux acides aminés substitués. Cette hypothèse a été reprise depuis par divers auteurs et renforcée par leurs résultats. Dans ces conditions, le système érythrocytaire qui normalement régénère l'hémoglobine à partir de la méthémoglobine formée dans les conditions physiologiques est incapable de le faire (ROSSI FANELLI et coll. 1957). Selon divers auteurs,

dans deux des 4 sous unités de l'hémoglobine M, celles qui comportent les chaînes anormales α ou β , le fer demeure donc sous forme oxydée (GERALD et EFRON 1961, MATSUKAWA et coll. 1964, HAYASHI et coll. 1966, KIKUCHI et coll. 1964), et seuls les deux hèmes situés à la surface des 2 chaînes polypeptidiques inaltérées sont capables de se combiner à l'oxygène.

II. - CARACTERES EXPERIMENTAUX COMMUNS A LA METHEMOGLOBINE UV ET AUX METHEMOGLOBINES M.

Du point de vue expérimental, la méthémoglobine UV présente des caractères semblables à ceux des méthémoglobines provenant des hémoglobines M, ce qui nous a incité à les comparer en considérant d'abord les caractéristiques essentielles des méthémoglobines M qui sont leur spectre d'absorption et leur mobilité électrophorétique.

A - Analogies spectrales entre méthémoglobine M et méthémoglobine UV.

1°) L'anomalie spectrale majeure des hémoglobines M par rapport à l'hémoglobine normale concerne la forme acide de leur méthémoglobine. Très peu ou pas d'anomalies sont observées dans les formes alcalines (GERALD 1958, GERALD et GEORGE 1959). Or, ce sont les mêmes observations que nous avons faites sur la méthémoglobine UV.

2°) Dans un cas de cyanose à hémoglobine M GERALD (1958) observe le spectre de la forme acide à pH 6,5 de la méthémoglobine obtenue par addition de ferricyanure de K à l'hémolysat entier (qui contient 30 p. 100 d'hémoglobine M) et le compare à celui de la méthémoglobine préparée de façon identique à partir d'hémoglobine A.

Le spectre de la méthémoglobine M qu'il reproduit présente une analogie très apparente avec celui de la méthémoglobine UV. Il note que le minimum à $600 \text{ m}\mu$ est moins prononcé et que le rapport d'absorption $K 500/K 600 = 2,56$ pour la méthémoglobine du sujet cyanosé et $2,22$ pour la méthémoglobine normale. Or, dans le cas de méthémoglobine "ferricyanure" de mouton par exemple, le rapport $K 500/K 600$ que nous avons mesuré est égal à $3,10$ et atteignait la valeur $2,5$ seulement pour la méthémoglobine UV de mouton.

GERALD et GEORGE (1959) rapportent encore que, dans le cas de méthémoglobine M_{Boston} et méthémoglobine $M_{\text{Saskatoon}}$, le rapport d'absorption $K 600/K 500$ est nettement plus élevé que pour la méthémoglobine A.

3°) Le maximum de la bande de Soret se situe, pour la méthémoglobine M, à $406 \text{ m}\mu$ comme pour la méthémoglobine normale, mais dans certains cas : méthémoglobine M_{Boston} et méthémoglobine $M_{\text{Saskatoon}}$ décrites par GERALD et GEORGE (1959), l'intensité de cette bande est plus faible que pour la méthémoglobine A. Or, la bande de Soret de la méthémoglobine UV dont le maximum est aussi à $405 \text{ m}\mu$ est plus faible que celle de la méthémoglobine "ferricyanure".

4°) La formation de cyanméthémoglobine par addition de CNK à la méthémoglobine permet de distinguer plusieurs types d'hémoglobine M. Dans le cas de l'hémoglobine M décrite par TITUS et HUISMAN (1963), ou de l'hémoglobine M_{Kankakee} (HELLER et coll. 1962), on trouve, comme pour la cyanméthémoglobine normale, une bande unique d'absorption à $540 \text{ m}\mu$, mais nettement plus faible, avec un rapport d'absorption $K 540/K 500$ plus bas, tout comme dans le cas de la méthémoglobine UV.

B - Comportement électrophorétique des méthémoglobines M et des méthémoglobines UV.

La technique d'électrophorèse a été très utilisée pour séparer l'hémoglobine type M de l'hémoglobine A. La séparation électrophorétique est facilitée par oxydation préalable de l'hémoglobine. Qu'il s'agisse d'hémoglobine M_{Boston} (GERALD 1958), d'hémoglobine M_{Saskatoon} (GERALD et GECRGE, 1959) ou d'hémoglobine M_{Kankakee} (HELLER et coll. 1962), les auteurs montrent que la séparation est meilleure dans les conditions de migration cathodique en tampon phosphate à pH 7,1 ou 7,2. Le composé le plus lent est, dans ces cas, l'hémoglobine M. Avec un même tampon et au même pH on obtient des résultats analogues avec la méthémoglobine UV, mais la différence de migration est toutefois très faible ; ce ne peut donc être un argument capital.

III. - RAPPROCHEMENT ENTRE METHEMOGLOBINE M ET METHEMOGLOBINE UV.

Dès les premières observations effectuées par HORLEIN et WEBER (1948) sur les cyanoses à hémoglobine M', les auteurs reconnaissent que c'est une modification de la fraction globine de ces molécules qui est responsable des anomalies des spectres d'absorption et du comportement électrophorétique de la méthémoglobine.

Pour ce qui est de la méthémoglobine UV, l'identité spectrale de l'hématine extraite de méthémoglobines chimiques et de méthémoglobines UV et le fait que l'irradiation ne modifie pas le spectre de l'hématine isolée à partir d'oxyhémoglobine, permettent de supposer que l'anomalie de la méthémoglobine UV ne concernerait pas son groupement prosthétique lui-même. Par contre, nous avons pu mettre en évidence une modification de la fraction globine qui se manifeste par la diminution du taux de groupements thiol réactifs.

Si, pour l'hémoglobine M, c'est la substitution d'un seul acide aminé qui entraîne les anomalies de cette hémoglobine, dans le cas de l'hémoglobine irradiée, rien ne permet de supposer que la modification des groupements thiol soit à l'origine des "anomalies" qui différencient ce composé de l'hémoglobine normale et le rapprochent de l'hémoglobine M, ni qu'elle soit la seule altération subie par la protéine. Mais, par contre, divers arguments montrent qu'il semble bien y avoir corrélation entre la diminution du taux de groupements thiol et les "anomalies" spectrales" qui constituent le caractère analogique essentiel entre méthémoglobine UV et méthémoglobine M. En effet :

1°) Nous avons observé des anomalies spectrales identiques sur des méthémoglobines UV provenant de l'irradiation d'hémoglobines d'espèces animales différentes (hémoglobine humaine adulte et foetale, hémoglobine de cheval, de mouton, de boeuf). Or, ces hémoglobines qui diffèrent entre elles par leur composition en acides aminés, et en particulier en résidus de cystéine non immédiatement réactifs, renferment toutes, les deux groupements thiol immédiatement réactifs dont le taux est modifié sous l'effet des rayons UV dans les mêmes proportions.

2°) En augmentant la durée d'irradiation, on augmente tout à la fois le taux des groupements thiol disparus et l'importance des anomalies spectrales.

3°) L'irradiation à pH alcalin qui élève le taux de groupements thiol qui ne réagissent plus, augmente aussi les anomalies des spectres.

4°) Enfin, l'irradiation en présence d'iodoacétamide (agent bloquant spécifiquement les groupements thiol réactifs) entraîne une diminution des anomalies spectrales. La méthémoglobine UV obtenue dans ces conditions se rapproche des méthémoglobines classiques.

5°) Indépendamment de la méthémoglobine UV, la méthémoglobine obtenue par lyophilisation d'oxyhémoglobine est un autre exemple sur lequel nous avons pu observer à la fois des anomalies spectrales semblables à celles de la méthémoglobine UV, en même temps qu'un taux de groupements thiol réactifs nettement inférieur au taux normal.

Si nous poursuivons le rapprochement entre méthémoglobine M et méthémoglobine UV, nous voyons que, dans le cas de méthémoglobine M il y a modification de la globine dans la région proche de l'hème. Or, dans la méthémoglobine UV, ce sont les groupements thiol immédiatement réactifs qui sont modifiés sous l'action des UV, c'est-à-dire ceux qui sont situés à côté de l'histidine qui assure la liaison hème-globine. Ceci a été démontré tout au moins pour l'hémoglobine de cheval et l'hémoglobine humaine. Les deux groupements thiol immédiatement réactifs de l'hémoglobine adulte humaine sont situés en position 93 des 2 chaînes β et sont adjacents aux histidines en position β 92 (histidines proximales) qui sont en étroit contact avec les atomes de fer des hèmes. Notons que, si l'hémoglobine foetale humaine ne possède pas les chaînes β qui sont celles auxquelles appartiennent les groupements thiol immédiatement réactifs, elle a dans les chaînes γ qui les remplacent un résidu de cystéine en position γ 92 qui occupe donc la même situation que le résidu de cystéine de l'hémoglobine adulte. On a pu aussi situer de façon certaine les groupements thiol immédiatement réactifs de l'hémoglobine de cheval dans la position qui suit directement celle qui est occupée par le résidu histidine lié à l'hème (ROSSI-FANELLI et coll., 1964).

La méthémoglobine UV présente donc bien une modification de sa fraction globine qui, comme pour la méthémoglobine M, se situe dans une région des chaînes polypeptidiques proche de l'hème. Il n'est donc pas invraisemblable, à priori, de penser que cette modification pourrait influencer les propriétés spectrales et la réactivité de la

méthémoglobine UV comme celle des méthémoglobines M : diminution de réactivité vis à vis du cyanure de potassium de la méthémoglobine UV comme de la méthémoglobine M, et surtout inaptitude des 2 sous unités de l'hémoglobine M qui comporte des chaînes anormales de se combiner à l'oxygène, ce qui est à rapprocher du fait que la désoxyhémoglobine obtenue à partir de méthémoglobine UV ne s'oxygène qu'à 50 %.

Mais y a-t-il relation de cause à effet entre ces phénomènes et la modification des groupements thiol réactifs ? Étant donné que les groupements thiol immédiatement réactifs sont adjacents à l'histidine proximale qui est le site de liaison entre la protéine et le fer de l'hème, il paraissait vraisemblable qu'ils étaient impliqués de quelque façon dans le processus qui accompagne la réaction réversible de l'hémoglobine avec l'oxygène. Divers auteurs ont essayé d'élucider leur rôle en les bloquant par différents réactifs (GUIDOTTI et coll. 1964, TAYLOR et coll. 1966). Le blocage de ces résidus de cystéine a, dans certains cas, une profonde influence sur l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Mais, étant donné que la nature et l'étendue de l'effet varient suivant l'agent bloquant, il en a été conclu que les groupements thiol immédiatement réactifs ne jouent pas par eux-mêmes un rôle essentiel dans l'équilibre en oxygène. L'absence de groupements thiol libres ne modifie pas nécessairement la forme normale de la courbe de dissociation de l'oxygène, et les changements dans l'équilibre en oxygène de l'hémoglobine semblent bien dus aux effets indirects causés par l'introduction de groupements étrangers dans la chaîne polypeptidique plutôt qu'à l'élimination des groupements thiol.

Quant à une relation de cause à effet entre la diminution du taux des groupements thiol réactifs et les caractéristiques spectrales de la méthémoglobine UV, c'est une hypothèse à éliminer puisque nous avons observé nous-même qu'on bloque les groupements thiol par

l'iodoacétamide sans entraîner aucune variation spectrale, et MCTCKAWA et coll. (1966) montrent que l'hémoglobine M, dont les anomalies spectrales sont analogues à celles de la méthémoglobine UV, possède des groupements thiol réactifs au nombre de 2, comme l'hémoglobine normale.

En résumé, la présence de groupements thiol réactifs libres n'est pas indispensable au fonctionnement de l'hémoglobine. leur blocage n'entraîne pas par lui-même les "anomalies" que nous avons observées sur la méthémoglobine UV, et cependant, ces "anomalies" sont, nous l'avons vu, en corrélation avec la diminution du taux de ces groupements dans la méthémoglobine UV. Comme elles ne peuvent pas être attribuées à l'introduction dans la molécule de groupements étrangers, il est à supposer qu'au cours de l'irradiation, des groupements de l'hémoglobine autres que les thiol sont modifiés et que l'altération qui en résulte et dans laquelle les groupements thiol sont impliqués sans en être la cause, confère à la méthémoglobine UV les caractères différentiels que nous avons pu observer.

Quelle peut être cette altération de la molécule d'hémoglobine ? Quel est le devenir des groupements thiol qui y sont impliqués ?

Nous savons qu'il se produit dans la méthémoglobine UV une modification de l'interaction hème-globine que révèle l'impossibilité de dissocier totalement l'hème de la globine, et dont nous avons pu montrer qu'elle est en relation avec la modification des groupements thiol et les "anomalies" spectrales ; ces trois caractères, nous les retrouvons aussi dans la méthémoglobine lyophilisée. Il est à présumer que cette modification de l'interaction hème-globine s'accompagne d'un changement dans la conformation de la molécule, or, on sait la relation qui existe entre le comportement fonctionnel de l'hémoglobine et son

état conformationnel. Rappelons que le coefficient d'extinction de la bande de Soret de la désoxyhémoglobine provenant de méthémoglobine UV est diminué, comme pour les chaînes isolées de l'hémoglobine, ou l'hémoglobine H (à 4 chaînes β) ou l'hémoglobine traitée par la carboxypeptidase A, qui sont des exemples d'hémoglobines modifiées, différentes dans leur conformation de la désoxyhémoglobine normale.

CONCLUSION

Il se produit, par irradiation UV, une réaction de méthémoglobini-
sation dont on a étudié les caractéristiques, mais on constate que la
méthémoglobine ainsi formée se différencie des méthémoglobines obtenues
par voie chimique par ses caractères spectraux et certaines de ses pro-
priétés physico-chimiques (comportement électrophorétique, résistance
à la dénaturation alcaline, labilité de la liaison hème-globine). Ces diffé-
rences paraissent en relation avec une modification de la fraction protéi-
que dans la région proche de l'hème et plus particulièrement avec le fait
qu'une fraction des groupements thiol immédiatement réactifs ne réagit
plus avec le chlorure mercurique, même après dénaturation de la protéi-
ne. Une analogie entre les caractères de la méthémoglobine UV et ceux
des méthémoglobines anormales, en particulier les méthémoglobines M,
a conduit à l'hypothèse d'une interprétation des caractéristiques de la
méthémoglobine UV.

Les groupements thiol de la méthémoglobine UV qui sont à
l'intérieur de la molécule ne sont pas modifiés ; il ne se produit pas, par
irradiation ultra-violette, une modification structurale entraînant une élon-
gation de la molécule telle qu'on l'observe, par exemple, sur la sérum-
albumine irradiée, mais les effets des rayons UV qui se manifestent par
la modification des groupements thiol proches de l'hème à la surface de
la molécule impliquent très vraisemblablement des changements de con-
formation de la molécule, en relation avec la perte d'une partie de la
fonction essentielle de l'hémoglobine, qui est celle de transporteur d'o-
xygène.

BIBLIOGRAPHIE

- AFIFI F. - Bull. Soc. Chim. Biol. (1961), XLIII, n° 4, 545.
- AFIFI F., HAISSINSKY M. et PUCHEAULT J. - C.R. Ac. Sc. (1960)
250, n° 1, 118.
- ALLISON A.C., CECIL R. - Biochem. J. (1958), 69, 27.
- ALLISON A.C., CECIL R., SNOW N.S. - Biochem. J. (1960), 74, 273.
- ANTONINI E. - Physiological Reviews (1965), 45, n° 1, 123.
- ANTONINI E., BUCCI E., FRONTICELLI C., WYMAN J., ROSSI-FANELLI A. - J. Mol. Biol. (1965), 12, 375.
- ANTONINI E., BUCCI E., FRONTICELLI C., CHIANCONE E.,
WYMAN J., ROSSI-FANELLI A. - J. Mol. Biol. (1966),
17, 29.
- ASSENDELT O.W., ZIJLSTRA W.G. - Clin. Chim. Acta (1965), 11,
n° 6, 571.
- BAGLIONI C. - Biochim. Biophys. Acta (1961), 48, 392.
- BENESCH R., GIBSON H., RUTH E. BENESCH - J. Biol. Chem. (1964),
239, n° 5, PC 1668.
- BENEZECH C., BASTONS G. - J. Chim. Phys. (1961), 58, n° 4, 386.
- BUCCI E., FRONTICELLI C., CHIANCONE E., WYMAN J.,
ANTONINI E., ROSSI-FANELLI A. - J. Mol. Biol. (1965),
12, 183.
- CECIL R., SNOW N.S. - Biochim. Biophys. Acta (1961), 48, 621.
- CORYELL C.D., STITT F., PAULING L. - J. Amer. Chem. Soc.
(1937), 59, 633.
- CULLIS A.F., MUIRHEAD H., PERUTZ M.F., ROSSMANN M.G.,
NORTH A.C.T. (1962) - Proc. Roy. Soc. A, 285, 161, cité par
ROSSI-FANELLI A., ANTONINI E., CAPUTO A., Adv.
in prot. chem. (1964), 19, 205.
- DRABKIN D.L., AUSTIN J.H. - J. Biol. Chem. (1935-36), 112, 89.
- DUANE BROWN W., JOAN-HECS AEGIROUDI AKOYUNOGLU - Arch.
Biochem. Biophys. (1964), 107, 239.
- ENGELHARD H., EIKENBERG K. cités par Mc LAREN A.D. and
SCHUGAR D. - Photochemistry of proteins and nucleic
acids. Pergamon Press, (1964), p. 121.

- FRICKE H., PETERSEN B.W. - Am. J. Roentgenology and Radium Therapy XVII (1927), 1, 611.
- FRONTICELLI C. - Ital. J. Biochem. (1962), XI, n° 6, 358.
- GERALD P.S., GEORGE P. - Science (1959), 129, 396.
- GERALD P.S., Blood - (1958), 13, 936.
- GERALD P.S., EFRON M.L. - Proc. Natl. Acad. Sc. U.S. (1961), 47, 1758.
- GIBSON Q.H. - Biochem. J. (1959), 71, 293.
- GUIDOTTI G., KONIGSBERG W. - J. Biol. Chem. (1964), 239, n° 5, 1474.
- HAURCOWITZ F. - Z. Physiol. Chem. (1929), 183, 78.
- HAYASHI N., MOTOKAWA Y., KIKUCHI G. - J. Biol. Chem. (1966), 211, 79.
- HEILMEYER L. - Spectrophotometry in Medicine (1943), Adam HILGER, London.
- HELLER F., HYMAN G.W., YAKULIS V.J., ROSENTHAL I.M. - Blood (1962), 20, 287.
- HISEY A., MORRISON D.B. - J. Biol. Chem. (1939), 130, 763.
- HOLDEN H.F. - Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci. (1936), 14, 291, cité par STEINHARDT J. and ZAISER E.M. - J. Amer. Chem. Soc. (1953), 75, 1599.
- HORLEIN H., WEBER G. - Deutsche Medicinische Wochenschrift (1948), 73, 476.
- HUISMAN T.H.J. - Adv. in Clin. Chem. (1963), 6. Acad. Press, New-York and London.
- HUISMAN T.H.J. - Arch. Biochem. Biophys. (1966), 113, 427.
- INGRAM V.M. - Biochim. Biophys. Acta (1958), 28, 539.
- JOLY M. - Biorheology (1965), vol. 2, n° 4, 207.
- KAJITA A., HASHIMOTO A., OKAZAKI T., KAZIRO K. - J. Biochem. (1961), 49, n° 6, 538.
- KIKUCHI G., HAYASHI N., TAMURA A. - Biochim. Biophys. Acta (1964), vol. 90, n° 1, 199.
- KONIGSBERG W., LEHMANN E. - Biochim. Biophys. Acta (1965), 107, n° 2, 266.
- KUMTA U.S., TAPPEL A.L. - Nature (1961), 191, 1304.

- LASER H. - Nature (1955), 176, 361.
- LEMBERG R., LEGGE J.W. - Hematin compounds and Bile pigments (1949) Interscience Publishers, Inc. New-York.
- LEWIS U.J. - J. Biol. Chem. (1954), 206, 109.
- LLCAY J. - Contribution à l'étude de la sédimentation globulaire - Effets de l'irradiation ultra-violette des protéines plasmatiques sur l'agglomération réversible des érythrocytes. Thèse Doct. ès-Sc. (1960).
- Mc LAREN A.D., SHUGAR D. - Photochemistry of proteins and nucleic acids. Pergamon Press, 1964.
- Mc LEAN D., GIESE A.C. - J. Biol. Chem. (1950), 537.
- MAJDANOV A.P., PELYKH I.K., MAKARENKO I.P. - UKRAIN Biokhim. Zh. (1961), 33, n° 1, 88.
- MIRSKY A.E., ANSON M.L. - J. Gen. Physiol. (1935-36), 19, 439.
- MOTOKAWA Y., HAYASHI N., KIKUCHI G. - Arch. Biochem. Biophys. (1964), 105, 612.
- PEREZ J.J. - In Techniques de laboratoire, tome I, p.483 (1954), Masson et C° Edit.
- RIGGS A.F., WOLBACH R.A. - J. Gen. Physiol. (1956), 39, 585.
- ROSEMEYER M.A., HUEHNS E.R. - J. Mol. Biol. (1967), 25, 253.
- ROSSI-FANELLI A., ANTONINI E., CAPUTO A. - Biochim. Biophys. Acta (1958), 30, 608.
- ROSSI-FANELLI A., ANTONINI E., CAPUTO A. - Adv. in Prot. Chem. (1964), 19, 205.
- STEINHARDT J., ZAISER E.M. - J. Amer. Chem. Soc. (1953), 75, 1599.
- SUSCILLON M., SIFFOINTE R. - Pathologie et Biologie (1966), vol. 14, n° 556, p. 297.
- TANFORD C. - J. Amer. Chem. Soc. (1957) vol. 79, 3931.
- TAYLOR J.F., ANTONINI E., BRUNCI M., WYMAN J. - J. Biol. Chem. (1966), 241, n° 1, 241.
- TEALE F.W. - Biochim. Biophys. Acta (1959), 35, 543.
- VESTLING C.S. - J. Biol. Chem. (1942), 143, 439.
- VINCZE A., RIES E., TANKA D. - Arch. Phys. Therap. Dtsch. (1961), 13, n° 3, 249.

DEUXIEME THESE

ORIGINALITE DE LAVOISIER
FACE A SES PRECURSEURS

Vu et permis d'imprimer
MONTPELLIER, le
Le Recteur de l'Académie
de MONTPELLIER,

Vu et approuvé
MONTPELLIER, le
Le Doyen de la Faculté
des Sciences,

